



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**A CONTRIBUIÇÃO DAS BOMBAS DE EFLUXO QacA e Smr PARA
A MULTIRRESISTÊNCIA EM *Staphylococcus aureus***

CLÁUDIA ALHINHO MOURATO

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA**

JANEIRO DE 2012



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**A CONTRIBUIÇÃO DAS BOMBAS DE EFLUXO QacA e Smr PARA
A MULTIRRESISTÊNCIA EM *Staphylococcus aureus***

CLÁUDIA ALHINHO MOURATO

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA**

Orientadora: Professora Doutora Isabel Couto

Laboratório onde o trabalho experimental foi desenvolvido:

Grupo de Micobactérias, Unidade de Microbiologia Médica

Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa

JANEIRO DE 2012

Os resultados apresentados foram objecto das seguintes comunicações em co-autoria:

Comunicações em Congressos:

Sofia S. Costa, Cláudia Mourato, Miguel Viveiros, José Melo-Cristino, Leonard Amaral, e Isabel Couto. 2011. Description of a novel pC194-family plasmid carrying the *smr* efflux pump gene, abstr. C1-617. 51st Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. (ICAAC). Chicago, Estados Unidos da América, 17-20 de Setembro de 2011.

Cláudia Mourato, Sofia S. Costa, Miguel Viveiros, Celeste Falcão, José Melo-Cristino, Leonard Amaral, e Isabel Couto. 2011. Multidrug resistance in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clinical isolate mediated by efflux pump QacA, abstr. PS6:62. Congresso Nacional de Microbiologia e Biotecnologia (MicroBiotec). Braga, Portugal, 1-3 de Dezembro de 2011.

Sofia S. Costa, Cláudia Mourato, Miguel Viveiros, José Melo Cristino, Leonard Amaral, e Isabel Couto. 2011. Description of a novel staphylococcal pC194-family plasmid carrying the *smr* efflux pump gene, abstr. PS6:75. Congresso Nacional de Microbiologia e Biotecnologia (MicroBiotec). Braga, Portugal, 1-3 de Dezembro de 2011.

Sofia S. Costa, Cláudia Mourato, Miguel Viveiros, José Melo Cristino, Leonard Amaral, e Isabel Couto. 2012. Resistance to biocides in clinical MRSA isolates conveyed by efflux pumps. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Londres, Inglaterra, 31 de Março-3 de Abril de 2012 (aceite para apresentação sob a forma de Poster).

Agradecimentos

À Professora Doutora Isabel Couto, pela sua orientação, interesse, conhecimentos e conselhos transmitidos ao longo deste trabalho. Pela disponibilidade, ajuda e empenho que demonstrou no decorrer desta Dissertação. Por ter possibilitado a minha chegada até aqui.

Ao Professor Doutor Miguel Viveiros, por me ter proporcionado a oportunidade de realizar o meu projecto de Dissertação no Grupo de Micobactérias e também pelos conselhos, assistência e ajuda transmitidos ao longo deste ano.

Ao Professor Doutor José Melo-Cristino, Director do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Santa Maria, pela cedência dos isolados clínicos estudados nesta Dissertação.

À Professora Doutora Hermínia de Lencastre, do Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa, pela cedência da estirpe de *S. aureus* RN4220 utilizada neste trabalho.

À Professora Doutora Ilda Sanches, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, pelo acesso ao aparelho de PFGE no seu laboratório.

À Sofia, por todo os conhecimentos, conselhos e ensinamentos transmitidos ao longo deste ano. Por todo o apoio e disponibilidade que sempre me dedicou, e sobretudo pela o entusiasmo e companheirismo com o qual sempre pude contar. Muito obrigada Sofie!

Aos meus colegas do Grupo de Micobactérias Diana, Pedro, Jorge e Ana pelo apoio, conhecimentos e companheirismo demonstrados. À Antónia e Lisa pela amizade e por partilharem comigo este percurso. À Catarina pelos bons momentos partilhados e pelo apoio nos longos dias de PFGE.

Às minhas amigas Carolina, Deolinda, Vera e Ana pela amizade de longa data, pelos momentos passados juntas, pelos desabafos partilhados e por todo o apoio que me tem dado.

Ao César, pelo amor, companheirismo, amizade, apoio e paciência demonstrados.

.... E por último, e mais importante à minha família...

Às minhas irmãs e aos meus sobrinhos pelo carinho, amizade e apoio que sempre demonstraram. Adoro-vos!

À minha avó, pela sua ajuda, fé e amor.

E por fim, aos meus pais por todo o amor, carinho e apoio incondicional que sempre me deram ao longo da minha vida, pelos sacrifícios que fizeram para eu chegar até aqui e por me ajudarem a alcançar os meus sonhos. A vocês dedico esta tese!

A todos, Muito Obrigada!

Resumo

O efluxo de compostos antimicrobianos é um mecanismo importante na multirresistência em bactérias. Bombas de efluxo codificadas em plasmídeos, como a QacA e a Smr, estão implicadas na susceptibilidade reduzida a biocidas, geralmente utilizados na prevenção e controlo de infecções nosocomiais, incluindo as causadas por estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina (MRSA).

Neste trabalho pretendeu-se avaliar a relevância de QacA e Smr no perfil de susceptibilidade dos isolados clínicos MRSA SM39 e SM52, que transportam os plasmídeos pSM39 e pSM52 com os determinantes *qacA* e *smr*, respectivamente.

A actividade de efluxo das estirpes SM39 e SM39 curada (sem pSM39) e das estirpes SM52 e RN4220:pSM52 (estirpe susceptível RN4220 transformada com pSM52) foi caracterizada por: (1) determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de biocidas, corantes e antibióticos, na ausência e presença dos inibidores de efluxo tioridazina, clorpromazina, verapamil e reserpina; e (2) fluorometria em tempo-real.

A determinação de CMIs demonstrou que a actividade de efluxo mediada por QacA e Smr está envolvida na susceptibilidade reduzida aos biocidas e corantes testados, que incluíram o brometo de hexadeciltrimetilamónio, a cetrimida, o cloreto de benzalcónio, a berberina, o cloreto de dequalínio, a pentamidina e o brometo de etídeo. Os ensaios fluorométricos confirmaram a elevada actividade de efluxo presente nas estirpes com os genes *qacA* ou *smr*.

A determinação de CMIs para antibióticos β -lactâmicos em conjunto com o teste da nitrocefina revelou a presença simultânea do gene *qacA* e de uma β -lactamase no plasmídeo pSM39.

Este trabalho evidencia a importância das bombas de efluxo QacA e Smr na resistência a biocidas em estirpes MRSA e na sobrevivência destas estirpes em ambiente hospitalar e na comunidade, para além de destacar a questão da potencial co-resistência entre biocidas e antibióticos.

Abstract

Drug efflux has become an important cause of multidrug resistance (MDR) in bacteria. Plasmid-encoded MDR efflux pumps, such as QacA and Smr, are implicated in reduced susceptibility to biocides, generally used in the prevention and control of nosocomial infections, including the ones caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

In this work, we aimed to evaluate the relevance of QacA and Smr to the susceptibility profile of the clinical MRSA isolates SM39 and SM52, which harbor the plasmids pSM39 and pSM52 that carry the determinants *qacA* and *smr*, respectively.

Efflux activity of strain SM39 and its plasmid-free counterpart, SM39 cured, SM52 and RN4220:pSM52 (susceptible strain RN4220 transformed with pSM52) was characterized by: (1) determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of biocides, dyes and antibiotics, in the absence and presence of the efflux inhibitors thioridazine, chlorpromazine, verapamil and reserpine; and (2) real-time fluorometry.

MIC determination showed that QacA and Smr mediated efflux was involved in the reduced susceptibility profile to the biocides and dyes tested, which included hexadecyltrimethylammonium bromide, cetrимide, benzalkonium chloride, berberine, dequalinium chloride, pentamidine and ethidium bromide. Fluorometric assays confirmed the higher efflux activity present in strains harboring *qacA* or *smr* genes.

Moreover, MIC determination for β -lactam antibiotics together with the nitrocefin test confirmed the presence of a β -lactamase in the plasmid carried by SM39 strain, pSM39.

This work highlights the relevance of QacA and Smr to the biocide resistance in MRSA strains, and consequently to their survival and maintenance in the hospital environment and in the community. Furthermore, the presence of a β -lactamase and *qacA* determinants in the the same plasmid reinforces the question of the potential biocide/antibiotic co-resistance in MRSA strains.

Índice Geral

Comunicações em congressos.....	i
Agradecimentos.....	ii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tabelas.....	xi
Lista de Abreviaturas.....	xiii

1 INTRODUÇÃO..... 1

1.1 Género *Staphylococcus* 1

1.1.1 Características gerais 1

1.1.2 *Staphylococcus aureus* e a sua importância clínica 1

1.2 Resistência aos compostos antimicrobianos em *S. aureus* 2

1.2.1 Compostos antimicrobianos..... 2

1.2.1.1 Antibióticos 2

1.2.1.2 Biocidas 3

1.2.2 Mecanismos de resistência aos compostos antimicrobianos 4

1.2.3 Resistência aos biocidas: a sua importância clínica 7

1.3 Resistência mediada por sistemas de efluxo 8

1.3.1 Classificação dos sistemas de efluxo 9

1.3.2 Sistemas de efluxo em *S. aureus* 13

1.3.2.1 Sistemas de efluxo codificados em plasmídeos 13

1.3.2.2 Sistemas de efluxo codificados no cromossoma 19

1.4 Métodos de avaliação da actividade de efluxo..... 23

1.5 Objectivos desta Dissertação..... 24

2 MATERIAL E MÉTODOS 25

2.1 Material 25

2.1.1 Estirpes bacterianas 25

2.1.2 Meios de cultura, enzimas e soluções	26
2.1.3 Outro material biológico	31
2.2 Métodos.....	31
2.2.1 Crescimento e manutenção das estirpes bacterianas	31
2.2.2 Processos de cura do plasmídeo das estirpes SM39 e SM52.....	32
2.2.2.1 Cura do plasmídeo pSM39	33
2.2.2.2 Cura do plasmídeo pSM52	34
2.2.3 Electrotransformação da estirpe RN4220 com o plasmídeo pSM52.....	36
2.2.4 Tipagem genética das estirpes em estudo	37
2.2.5 Caracterização fenotípica das estirpes em estudo	37
2.2.5.1 Determinação de concentrações mínimas inibitórias de compostos antimicrobianos	37
2.2.5.2 Determinação de concentrações mínimas inibitórias de inibidores de efluxo.....	39
2.2.5.3 Determinação de concentrações mínimas inibitórias de compostos antimicrobianos na presença de inibidores de efluxo.....	39
2.2.5.4 Detecção de β -lactamases pelo Teste da Nitrocefina	40
2.2.5.5 Detecção de sistemas de efluxo activos por um método semi-automático de fluorometria em tempo-real	41
2.2.6 Caracterização genotípica das estirpes SM39, SM39 curada, SM52 e RN4220:pSM52	43
2.2.6.1 Extracção de DNA plasmídico	43
2.2.6.2 Detecção por PCR da presença dos genes em estudo	45
3 RESULTADOS	46
3.1 Estudo da bomba de efluxo QacA	46
3.1.1 Cura do plasmídeo pSM39	46
3.1.2 Caracterização de estirpes SM39, SM39 curada e RN4220	48
3.1.2.1 Determinação de concentrações mínimas inibitórias de compostos antimicrobianos e de inibidores de efluxo.....	48
3.1.2.2 Produção de β -lactamases	53
3.1.2.3 Detecção de efluxo por fluorometria em tempo-real	54
3.2 Estudo da bomba de efluxo Smr	60

3.2.1 Cura do plasmídeo pSM52	60
3.2.1.1 Crescimento na presença de CPZ, NOV e PZ.....	61
3.2.1.2 Crescimento a temperaturas elevadas	62
3.2.1.3 Crescimento na presença de SDS	63
3.2.1.4 Crescimento na presença de SDS a 42°C	64
3.2.1.5 Plaqueamento directo a partir de “stock” a – 80°C	65
3.2.2 Electrotransformação da estirpe RN4220 com o plasmídeo pSM52.....	65
3.2.3 Caracterização das estirpes SM52, RN4220, RN4220:pSM52	67
3.2.3.1 Determinação de concentrações mínimas inibitórias de compostos antimicrobianos e de inibidores de efluxo.....	67
3.2.3.2 Detecção de efluxo por fluorometria em tempo-real	72
4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	78
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

Índice de Figuras

Figura 1. Mecanismos de resistência a compostos antimicrobianos em bactérias.....	5
Figura 2. Modelo estrutural dos transportadores pertencentes à família ABC.....	9
Figura 3. Representação de bombas de efluxo MDR pertencentes às cinco famílias de transportadores em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	10
Figura 4. Modelo estrutural dos transportadores pertencentes à MFS com (A) 12 segmentos transmembranares e (B) 14 segmentos transmembranares.....	11
Figura 5. Modelo estrutural dos transportadores pertencentes à família SMR.....	12
Figura 6. Modelo estrutural dos transportadores pertencentes à família RND.....	12
Figura 7. Electroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de amplificação de um fragmento interno ao gene <i>qacA</i> após extracção de DNA plasmídico de duas colónias fluorescentes da passagem #7 com CPZ da estirpe SM39.....	47
Figura 8. Electroforese em gel de agarose SeaKem LE 1% dos produtos de macro-restrição com <i>SmaI</i> por PFGE.	48
Figura 9. Teste da produção de β -lactamases pelo sistema “BBL™ DrySlide™ Nitrocefín”.	54
Figura 10. Ensaio de acumulação de EtBr para as estirpes RN4220, SM39 e SM39 curada, na presença de concentrações crescentes de EtBr.	55
Figura 11. Ensaio de acumulação de EtBr para as estirpes RN4220, SM39 e SM39 curada, na presença de concentrações subinibitórias de inibidores de efluxo	57
Figura 12. Ensaio de efluxo para as estirpes RN4220, SM39 e SM39 curada, na presença de glucose a 0,4%, com e sem verapamil (VER) à concentração subinibitória de 200 mg/L.....	59
Figura 13. Electroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de amplificação de um fragmento interno ao gene <i>smr</i> após extracção de DNA plasmídico extraído das colónias fluorescentes da passagem #19 com novobiocina da estirpe SM52.	62

Figura 14. Electroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de amplificação de um fragmento interno ao gene <i>smr</i> após extracção de DNA plasmídico extraído das colónias fluorescentes do tratamento com 0,002% SDS.....	64
Figura 15. Electroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de amplificação de um fragmento interno ao gene <i>smr</i> após extracção de DNA plasmídico extraído das colónias fluorescentes do processo de cura pelo plaqueamento directo a partir de “stock” a – 80°C	65
Figura 16. Electroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de amplificação de um fragmento interno ao gene <i>smr</i> após extracção de DNA plasmídico extraído das quatro colónias resultantes da electrotransformação de RN4220 com o pSM52	66
Figura 17. Electroforese em gel de agarose SeaKem LE a 1% dos produtos de macro-restrição com <i>SmaI</i> por PFGE	67
Figura 18. Ensaio de acumulação de EtBr para as estirpes SM52, RN4220 e RN4220:pSM52 na presença de concentrações crescentes de EtBr	73
Figura 19. Ensaio de acumulação de EtBr para as estirpes SM52, RN4220 e RN4220:pSM52, na presença de concentrações subinibitórias de inibidores de efluxo	75
Figura 20. Ensaio de efluxo para as estirpes SM52, RN4220 e RN4220:pSM52, na presença de glucose a 0,4%, com ou sem verapamil (VER) à concentração subinibitória de 200 mg/L.....	77

Índice de Tabelas

Tabela 1. Principais classes de biocidas anti-sépticos, desinfetantes e preservantes e os seus mecanismos de acção	4
Tabela 2. Mecanismos de acção e principais mecanismos de resistência de algumas classes de antibióticos em <i>S. aureus</i>	6
Tabela 3. Sistemas de efluxo codificados em plasmídeos em <i>S. aureus</i>	14
Tabela 4. Determinantes <i>qacA</i> , <i>qacB</i> e <i>smr</i> e resistência a compostos de amónio quaternário (QACs) e outros biocidas	15
Tabela 5. Sistemas de efluxo codificados no cromossoma de <i>S. aureus</i>	20
Tabela 6. Estirpes de <i>S. aureus</i> utilizadas nesta Dissertação	25
Tabela 7. Composição dos meios de cultura utilizados.	26
Tabela 8. Enzimas utilizadas.....	27
Tabela 9. Composição e modo de preparação de soluções tampão utilizadas.....	27
Tabela 10. Composição e modo de preparação de soluções de inibidores de efluxo utilizadas	28
Tabela 11. Composição e modo de preparação de soluções de biocidas e corantes utilizadas	29
Tabela 12. Composição e modo de preparação de soluções de antibióticos utilizadas..	30
Tabela 13. Sequências nucleotídicas dos “primers” utilizados neste trabalho e tamanho esperado do amplicão, em pares de bases (pb)	31
Tabela 14. Gama de concentrações de biocidas e corantes testadas na determinação de CMIs para as estirpes em estudo.....	38
Tabela 15. Gama de concentrações de antibióticos testadas na determinação de CMIs para as estirpes em estudo.....	39
Tabela 16. Valores de CMIs de diferentes compostos antimicrobianos para as estirpes RN4220, SM39 e SM39 curada.....	49
Tabela 17. Valores de CMIs de inibidores de efluxo para as estirpes em estudo.....	51
Tabela 18. Valores de CMIs de compostos antimicrobianos na ausência e presença de inibidores de efluxo para as estirpes RN4220, SM39 e SM39 curada.....	52
Tabela 19. Valores de CMIs de diferentes compostos antimicrobianos para as estirpes SM52, RN4220 e RN4220:pSM52.....	68

Tabela 20. Valores de CMIs de inibidores de efluxo para as estirpes em estudo.....	69
Tabela 21. Valores de CMIs de compostos antimicrobianos na ausência e presença de inibidores de efluxo para as estirpes SM52, RN4220 e RN4220:pSM52.....	71
Tabela 22. Alguns plasmídeos que conferem multirresistência descritos para <i>S.</i> <i>aureus</i>	84

Lista de Abreviaturas

A – Adenina

ABC – “ATP-binding cassette”

ACR – Acriflavina

AMP – Ampicilina

ATP – Trifosfato de adenosina, de “adenosine triphosphate”

BAC – Cloreto de benzalcónio

BERB – Berberina

C – Citosina

CET – Cetrimida

CHL – Cloranfenicol

CHX – Clorexidina

CIP – Ciprofloxacina

CLSI – “Clinical and Laboratory Standards Institute”

CMB – Concentração mínima bactericida

CMI – Concentração mínima inibitória

CPC – Cloreto de cetilpiridínio

CPZ – Clorpromazina

CTAB - Brometo de hexadeciltrimetilamónio

CV – Violeta de cristal

DC – Cloreto de dequalínio

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico, de “deoxyribonucleoside acid”

DO – Densidade óptica

IE – Inibidor de efluxo

ERY – Eritromicina

EtBr – Brometo de etídeo

EtOH – Etanol

FMP – Força motriz protónica

G – Guanina

GEN – Gentamicina

KAN – Canamicina

Kb – Kilobases

LEV – Levofloxacin

MATE – “Multidrug and Toxic Compound Extrusion”

MDR – Multirresistência/Resistência a múltiplos compostos, de “multidrug resistance”

MFS – “Major Facilitator Superfamily”

MHB – “Mueller-Hinton broth”

MHA - “Mueller-Hinton agar”

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina, de “methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”

MSSA – *Staphylococcus aureus* sensíveis à metilina, de “methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*”

NOR - Norfloxacin

NOV – Novobiocina

OXA - Oxacilina

pb – Pares de bases

PA – “Penassay agar”

PB – “Penassay broth”

PBS – Tampão fosfato salino, de “phosphate buffered saline”

PBP - Proteína de ligação à penicilina, de “penicillin-binding protein”

PCR – Reacção de polimerase em cadeia, de “polymerase chain reaction”

PEN - Penicilina

PFGE – Electroforese em campo pulsado, de “pulsed field gel electrophoresis”

PT – Pentamidina

PZ - Promazina

QACs – Compostos de amónio quaternário, de “quaternary ammonium compounds”

RES – Reserpina

RNA - Ácido ribonucleico, de “ribonucleic acid”

RND – “Resistance-Nodulation-Cell Division”

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SMR – “Small Multidrug Resistance”

SPX – Sparfloxacina

T - Timina

TET – Tetraciclina

TMP – Trimetoprim

TPP – Brometo de tetrafenilfosfónio

TSA – “Tryptone soya agar”

TSB – “Tryptone soya broth”

TZ – Tioridazina

UV - Ultravioleta

VAN - Vancomicina

VER – Verapamil

1 Introdução

1.1 Género *Staphylococcus*

1.1.1 Características gerais

O género *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae* que engloba também os géneros *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus* e *Salinicoccus*, sendo actualmente composto por 44 espécies e 21 subespécies (26).

As bactérias do género *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, com diâmetro de 0,5 a 1,5 µm, imovéis, capsulados e não esporulados. Estas bactérias crescem geralmente em forma de cacho, podendo também ser observadas como cocos isolados, aos pares ou em cadeias curtas (5, 69). Os estafilococos são anaeróbios facultativos e a maioria das espécies é produtora de catalase (5, 71). Uma das suas componentes estruturais mais importantes é a parede celular, constituída por peptidoglicano, proteína A e ácidos teicóicos (71).

No Homem, estas bactérias são parte da flora comensal da pele e mucosas e apresentam geralmente uma relação benigna com o hospedeiro (5). As espécies de estafilococos mais frequentemente encontradas em humanos incluem *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus scheleiferi*. De entre estas espécies, apenas *S. aureus* e *S. saprophyticus* são considerados agentes patogénicos primários (71). Porém, *S. aureus* é o agente patogénico humano mais importante.

1.1.2 *Staphylococcus aureus* e a sua importância clínica

S. aureus é responsável por uma grande parte das infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade, tornando-o num agente patogénico de elevada relevância clínica. O seu nicho ecológico primário é as narinas anteriores, sendo 20% a 40% da população normal portadora nasal de *S. aureus*. A nível hospitalar essa percentagem pode aumentar até cerca de 60% (54, 71). A infecção por *S. aureus* pode ocorrer por

disseminação a partir da mucosa nasal, da pele ou de uma lesão superficial e também pela transmissão para o Homem através de contacto directo ou contacto indirecto com objectos contaminados ou por via aérea. A sua virulência deve-se à produção de diversos factores de virulência como toxinas e enzimas que contribuem para a sua patogenicidade (71).

As doenças infecciosas causadas por *S. aureus* são geralmente lesões superficiais da pele como abscessos ou impetigo, podendo evoluir para infecções sistémicas e potencialmente fatais como a meningite, osteomielite, endocardite, pneumonia, septicémia, síndrome de pele escaldada e síndrome de choque tóxico (5, 12, 63, 71).

A importância clínica de *S. aureus* não se deve somente aos factores de virulência e patogenicidade que apresenta, mas também à fácil aquisição de resistência a vários compostos antimicrobianos (12).

1.2 Resistência aos compostos antimicrobianos em *S. aureus*

1.2.1 Compostos antimicrobianos

1.2.1.1 Antibióticos

Entende-se por antibiótico uma substância de origem natural ou sintética, que possui propriedades de toxicidade selectiva, podendo ter uma acção bactericida (capacidade de eliminar células bacterianas a uma determinada concentração e num período de tempo específico) ou uma acção bacteriostática (capacidade de inibir o crescimento bacteriano a uma determinada concentração) (16, 36).

Os antibióticos podem actuar na célula bacteriana ao nível da inibição da: (i) biossíntese de nucleótidos (*p.e.* sulfonamidas e diaminopirimidinas); (ii) síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA, de “deoxyribonucleic acid”) (*p.e.* quinolonas); (iii) síntese de ácido ribonucleico (RNA, de “ribonucleic acid”) (*p.e.* rifampicina); (iv) síntese proteica (*p.e.* aminoglicosídeos, macrólidos e cloranfenicol); (v) integridade da membrana celular (*p.e.* polimixinas) e (vi) síntese da parede celular (*p.e.* β -lactâmicos e glicopéptidos) (16, 36).

1.2.1.2 Biocidas

Os biocidas referem-se a uma extensa categoria de moléculas inorgânicas ou orgânicas sintéticas que incluem anti-sépticos, desinfectantes e preservantes (14, 29, 122). Os biocidas com propriedades anti-sépticas são utilizados com o objectivo de eliminar ou inibir o crescimento de organismos em tecidos vivos, enquanto os biocidas com propriedades desinfectantes são utilizados em objectos ou superfícies inanimadas. Por sua vez, os biocidas com propriedades preservantes são aplicados em produtos alimentares e cosméticos, entre outros, com o objectivo de eliminar ou prevenir o crescimento de microrganismos indesejáveis nesses produtos (32, 69).

A nível clínico, estes compostos são utilizados na descontaminação de ambientes hospitalares e laboratórios, na esterilização de equipamento médico e na desinfecção da pele (69).

Os biocidas actuam de um modo distinto dos antibióticos, uma vez que a sua acção é relativamente não-específica, isto é, podem actuar num ou em múltiplos alvos celulares. Estes compostos podem ser divididos em quatro grandes categorias, de acordo com o seu modo de acção (Tabela 1): (i) os oxidantes, que actuam por oxidação do material orgânico celular; (ii) os electrofílicos, que reagem covalentemente com nucleófilos celulares para inactivar enzimas iniciando a formação de radicais livres intracelulares; (iii) os de acção lítica, que destabilizam a integridade membranar, causando a lise celular e (iv) os protonóforos, que interferem com a capacidade da membrana celular em manter um equilíbrio do pH, promovendo a acidificação celular e disrupção generalizada do metabolismo (14, 32, 69).

Tabela 1. Principais classes de biocidas anti-sépticos, desinfetantes e preservantes e os seus mecanismos de acção (14, 32, 69).

Classes de Biocidas	Biocidas	Propriedades	Ação
Oxidantes	Cloro e peróxidos	Anti-sépticos, desinfetantes	Oxidação do material orgânico
Metais pesados	Prata, cobre e mercúrio	Anti-sépticos, desinfetantes, preservantes	Agentes electrofílicos - formação de radicais livres
Aldeídos	Formaldeído, isotiazolonas	Desinfetantes, esterilização e preservantes	
Catiões orgânicos Monovalentes	Compostos de amónio quaternário (QACs) (cetrimida, cloreto de benzalcónio), Corantes (brometo de etídeo, acriflavina)	Anti-sépticos, desinfetantes	Disrupção da membrana citoplasmática, desnaturação proteica e lise celular
Catiões orgânicos Divalentes	QACs (cloreto de dequalínio) Biguanidinas (clorexidina), Diamidinas (pentamidina)		
Álcoois	Etanol e isopropanol	Anti-sépticos, desinfetantes, preservantes	Acidificação celular e disrupção generalizada do metabolismo
Ácidos fracos	Ácido benzóico e ácido sórbico	Desinfetantes, esterilização	

1.2.2 Mecanismos de resistência aos compostos antimicrobianos

Os microrganismos têm desenvolvido várias estratégias para subsistir aos efeitos tóxicos exercidos por antibióticos e outros compostos antimicrobianos. São quatro os mecanismos principais que estão envolvidos na resistência bacteriana aos antibióticos (Figura 1) (31, 111): (i) a produção de enzimas que inactivam os antibióticos por hidrólise ou pela formação de derivados inactivos, como no caso das β -lactamases e das enzimas que fosforilam, adenilam ou acetilam antibióticos aminoglicosídeos; (ii) a alteração do alvo celular, seja por mutação ou modificação enzimática, reduzindo a afinidade do alvo para o antibiótico; (iii) a redução da entrada do antibiótico na célula, diminuindo a sua concentração intracelular, através de uma baixa permeabilidade da membrana e pela perda de porinas; e (iv) a redução da concentração intracelular do antibiótico, através da sua extrusão por sistemas de efluxo.

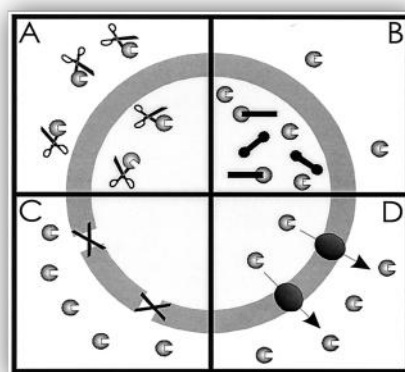


Figura 1. Mecanismos de resistência a compostos antimicrobianos em bactérias. (A) Inativação do antibiótico, (B) Alteração do alvo, (C) Prevenção do influxo do antibiótico, (D) Extrusão ativa do antibiótico da célula. Adaptado de (94).

A resistência a compostos antimicrobianos pode ser uma propriedade intrínseca da bactéria, exemplificada pela baixa permeabilidade da membrana celular de bactérias Gram-negativas a estes compostos, ou pode ser adquirida pela ocorrência de mutações genéticas ou pela aquisição de genes exógenos localizados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos ou transposões (69, 102).

A multirresistência ou resistência a múltiplos compostos (MDR, de “multidrug resistance”) tem vindo a aumentar consideravelmente entre microrganismos patogénicos como *S. aureus*, causando graves problemas no controlo das infeções bacterianas (87). A definição de MDR é geralmente aplicada quando uma bactéria apresenta um fenótipo de resistência a três ou mais classes de antibióticos (111). No entanto, ao longo desta Dissertação, o termo MDR irá ser utilizado num sentido mais amplo, de resistência a múltiplas classes de compostos antimicrobianos, não necessariamente antibióticos.

Um dos factores que promove a emergência da multirresistência é a utilização generalizada, extensiva e inadequada de antibióticos e outros compostos antimicrobianos (62). A multirresistência, por sua vez, conduz à ineficácia destes mesmos agentes antimicrobianos no tratamento destas infeções bacterianas (87).

A emergência de diferentes mecanismos de resistência aos antibióticos em *S. aureus* (Tabela 2), aliado ao seu potencial patogénico, leva a que esta bactéria seja um dos agentes patogénicos humanos mais relevantes em Saúde Pública (62, 63).

Tabela 2. Mecanismos de acção e principais mecanismos de resistência de algumas classes de antibióticos em *S. aureus* (62, 63, 87).

Classe de Antibióticos	Alvo e Mecanismo de Acção	Principais mecanismos de resistência	Localização do gene de resistência
β-lactâmicos	Inibição da síntese da parede celular: inibição da biossíntese do peptidoglicano pela ligação do antibiótico às PBPs (“penicillin-binding protein”)	Hidrólise enzimática do anel β -lactâmico por β -lactamases. Produção de PBP alternativa (PBP2a) com afinidade reduzida para antibióticos β -lactâmicos.	Cromossoma, plasmídeos, transposões.
Fluoroquinolonas	Inibição da síntese de DNA pela inibição das enzimas DNA girase e/ou topoisomerase IV envolvidas na replicação.	Modificação do alvo celular por aquisição de mutações nos genes <i>grlA/grlB</i> e/ou <i>gyrA/gyrB</i>	Cromossoma
Tetraciclina	Inibição da síntese proteica pela ligação à subunidade 30S do ribossoma	Extrusão do antibiótico por sistemas de efluxo	Cromossoma, plasmídeos,
Aminoglicosídeos	Inibição da síntese proteica pela ligação à subunidade 30S do ribossoma	Modificação enzimática do antibiótico por acetiltransferases ou fosfotransferases	Cromossoma, plasmídeos, transposões
Cloranfenicol	Inibição da síntese proteica pela ligação à subunidade 50S do ribossoma	Modificação enzimática do antibiótico por acetiltransferases	Plasmídeos
Glicopéptidos	Inibição da síntese da parede celular por interacção com os seus precursores	Alteração na biossíntese dos precursores do peptidoglicano	Cromossoma, plasmídeos, transposões

As infecções originadas por *S. aureus*, em particular por estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA, de “methicillin-resistant *S. aureus*”), são umas das principais causas de infecções nosocomiais, apresentando uma mortalidade associada bastante elevada (44, 62). As estirpes MRSA, para além de resistentes a antibióticos β -lactâmicos, podem ainda apresentar outros determinantes de resistência a um ou mais antibióticos, como os aminoglicosídeos, macrólidos e tetraciclina (13). A descrição das primeiras estirpes MRSA com susceptibilidade reduzida em 1997 ou mesmo resistência à vancomicina em 2002, um dos antibióticos de escolha no tratamento das infecções por

MRSA (13, 40, 44, 92, 93), veio tornar ainda mais preocupante o problema da resistência aos antibióticos nestas bactérias.

Com o aumento de resistência a um elevado número de antibióticos, as opções terapêuticas para o tratamento de infecções por estirpes MRSA multirresistentes encontram-se reduzidas, existindo um diminuto número de antibióticos de recurso, como a linezolida (oxazolidinonas), a daptomicina (lipopéptido) e a tigeciclina (glicilciclina) (12, 44, 60). Assim, as medidas de prevenção e controlo destas infecções são de extrema importância de forma a reduzir a transmissão e disseminação destas bactérias tanto a nível hospitalar como na comunidade (62). Estas medidas passam muitas vezes pelo uso de mupirocina e pela utilização de compostos anti-sépticos e desinfetantes (62, 107).

1.2.3 Resistência aos biocidas: a sua importância clínica

Os biocidas com actividade desinfetante e anti-séptica são bastante utilizados nas práticas de prevenção e controlo da disseminação de agentes patogénicos em hospitais e na comunidade, como *S. aureus*. Estes biocidas são aplicados na descontaminação de superfícies, na desinfecção das mãos e na descolonização de doentes. Como exemplo, é recomendado o uso de clorexidina e cloreto de benzalcónio na descolonização da pele de grupos de alto risco e nos banhos dos doentes para a prevenção de infecções nosocomiais causadas por MRSA (19).

Enquanto os mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos têm sido amplamente estudados ao longo dos anos, os mecanismos de susceptibilidade reduzida a biocidas não se encontram tão bem descritos (102). Porém, o crescente uso de biocidas e o aparecimento de estirpes resistentes despertaram a atenção dos investigadores sobre a forma como os microrganismos respondem aos biocidas. A resistência a biocidas catiónicos, como os compostos de amónio quaternário (QACs) cetrimida e cloreto de benzalcónio, a clorexidina, as diamidinas e também o brometo de etídeo tem sido descrita em *S. aureus*, incluindo estirpes resistentes a antibióticos, como estirpes MRSA (2, 25, 103).

A susceptibilidade reduzida a biocidas neste microorganismo tem sido relacionada com a presença de mecanismos de efluxo MDR, estando já descritas várias bombas de

efluxo MDR que promovem a extrusão destes compostos (90). Estas bombas de efluxo MDR podem encontrar-se codificadas no cromossoma (*p. e.* NorA, NorB, MepA, SepA), ou em plasmídeos (*p. e.* QacA, QacB, Smr) (90, 104, 109).

De entre os vários mecanismos utilizados pelas bactérias para resistir ao efeito dos compostos antimicrobianos, os sistemas de efluxo MDR são os mais “promíscuos”, uma vez que podem conduzir a extrusão quer de antibióticos quer de biocidas. Assim, a utilização generalizada de biocidas pode promover uma pressão selectiva contribuindo para a emergência de susceptibilidade reduzida aos biocidas, e potencialmente para a resistência cruzada entre biocidas e antibióticos (111).

A pressão selectiva por parte de biocidas (ou antibióticos) pode promover igualmente a co-resistência entre estes compostos antimicrobianos, uma vez que plasmídeos que possuem genes que codificam para bombas de efluxo MDR transportam frequentemente outros determinantes de resistência a antibióticos (28, 43, 63, 106). Para além disso, a localização destes sistemas de efluxo MDR em plasmídeos facilita a transmissão horizontal genética destes determinantes de resistência entre estirpes da mesma espécie e potencialmente de espécies distintas (111). A co-resistência a antibióticos e biocidas já se encontra descrita para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (50, 118).

A susceptibilidade reduzida aos biocidas representa assim um problema grave, sendo importante determinar a susceptibilidade de isolados MRSA a estes compostos e estudar os mecanismos de efluxo subjacentes.

1.3 Resistência mediada por sistemas de efluxo

Os mecanismos de transporte, incluindo os processos de efluxo, estão presentes em todos os organismos, sendo utilizados por células procariotas e eucariotas para estabelecer a carga e o gradiente de pH adequados através da membrana citoplasmática e expelir resíduos e outras substâncias potencialmente tóxicas para a célula (85, 88).

As bombas de efluxo bacterianas são proteínas de transporte responsáveis pela secreção de toxinas ou antibióticos produzidos pela própria célula, e pelo efluxo de compostos tóxicos, como antibióticos e resíduos celulares (65, 85, 123).

A extrusão de um antibiótico, pelo processo dependente de energia designado por efluxo activo, mediado por bombas de efluxo, é uma das estratégias utilizadas para diminuir a concentração intracelular de um agente antimicrobiano (65). Estas bombas de efluxo podem ser específicas para um substrato/antibiótico ou podem transportar uma variedade de compostos estruturalmente distintos, incluindo diferentes classes de antibióticos (bombas de efluxo MDR). Algumas bombas de efluxo MDR estão envolvidas na patogenicidade bacteriana, ou seja, na colonização e sobrevivência da bactéria no hospedeiro, pois efluxam determinantes de virulência, como adesinas, toxinas e outras proteínas que são importantes para a colonização e infecção de células humanas e animais (85).

1.3.1 Classificação dos sistemas de efluxo

Os sistemas de efluxo MDR podem ser classificados com base em três critérios, a fonte energética, a relação filogenética e a especificidade do substrato. Com base na fonte energética, estes sistemas são divididos em duas classes principais: os transportadores activos primários e os transportadores activos secundários (4).

Os transportadores activos primários do tipo ABC (de “ATP-binding cassette”) utilizam a energia livre da hidrólise de ATP para bombear os compostos para fora da célula (Figura 2) (34, 94).

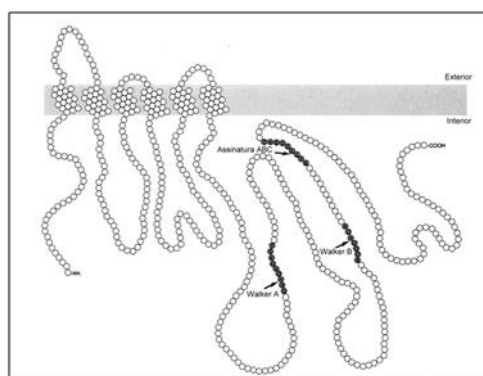


Figura 2. Modelo estrutural dos transportadores pertencentes à família ABC. Adaptado de (94).

Os transportadores activos secundários utilizam o gradiente electroquímico transmembranar, a força motriz protónica (FMP), de protões ou gradiente de iões sódio, para permitir a extrusão de compostos da célula (34, 94). Em bactérias, os transportadores activos secundários são predominantes e muitos deles são sistemas de efluxo MDR (65).

Com base em critérios estruturais, estes sistemas podem ser subdivididos em quatro famílias distintas: a “major facilitator superfamily” (MFS), a família “small multidrug resistance” (SMR), a família “resistance-nodulation-cell division” (RND) e a família “multidrug and toxic compound extrusion” (MATE) (65, 85, 94). Estas famílias encontram-se todas em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, à excepção dos transportadores do tipo RND, identificados apenas em bactérias Gram-negativas (Figura 3) (94).

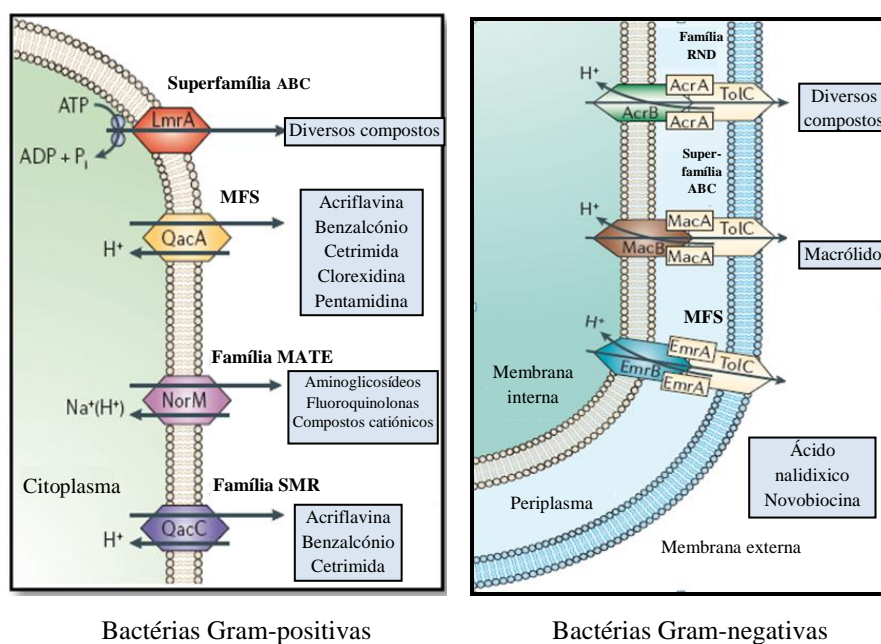


Figura 3. Representação de bombas de efluxo MDR pertencentes às cinco famílias de transportadores em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Adaptado de (87).

– Superfamília “Major Facilitator”

A Superfamília MF (MFS) é composta por proteínas transportadoras de membrana que estão envolvidas no sinporte, antiporte ou uniporte de vários substratos, como

açúcares, intermediários do ciclo de Krebs, ésteres de fosfato, oligossacarídeos e antibióticos (85, 86, 94).

Estas proteínas são compostas por aproximadamente 400 resíduos de aminoácidos e podem ser divididas em dois grupos distintos, consoante o número de segmentos transmembranares que possuem; as que apresentam 12 segmentos transmembranares (Figura 4-A) e as que apresentam 14 segmentos transmembranares (Figura 4-B) (10, 85, 86, 94). As proteínas desta superfamília possuem vários motivos de aminoácidos altamente conservados, provavelmente essenciais para a estrutura e/ou função destes transportadores (11).

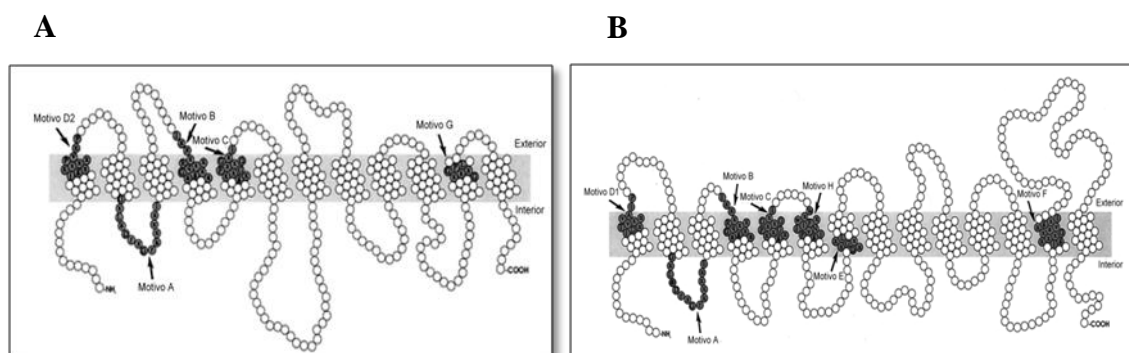


Figura 4. Modelo estrutural dos transportadores pertencentes à MFS com (A) 12 segmentos transmembranares e (B) 14 segmentos transmembranares. Adaptado de (94).

– Família “Small Multidrug Resistance”

As proteínas da família SMR estão envolvidas no efluxo de compostos catiónicos lipofílicos (65). Estas proteínas são os transportadores secundários mais pequenos, com cerca de 110 resíduos de aminoácidos e quatro segmentos transmembranares (Figura 5) (33, 85, 94). Devido ao pequeno tamanho destes transportadores, tem sido proposto que possam funcionar como complexos homooligoméricos, compostos por três monómeros (85, 94).

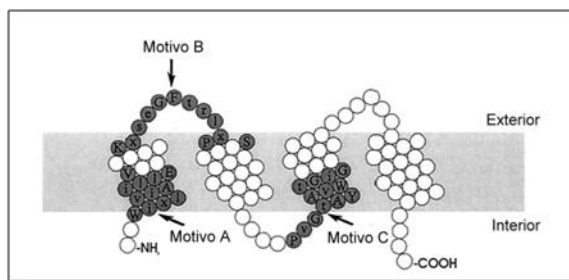


Figura 5. Modelo estrutural dos transportadores pertencentes à família SMR. Adaptado de (94).

– Família “Resistance-Nodulation-Cell Division”

A família RND está envolvida no transporte de moléculas lipofílicas ou anfifílicas, ou de cátions divalentes tóxicos; sendo também responsável pela tolerância de algumas estirpes bacterianas a solventes (65).

As proteínas de efluxo da família RND são compostas por aproximadamente 1000 resíduos de aminoácidos e 12 segmentos transmembranais (Figura 6) (10, 85, 94). Estas proteínas encontram-se em bactérias Gram-negativas, estando envolvidas em sistemas tripartidos, em associação com uma proteína de fusão membranar (MFP, de “membrane fusion protein”) que se estende ao espaço periplasmático, e uma proteína de membrana exterior (OMP, de “outer membrane protein”) que permite o transporte através da membrana (65, 94).

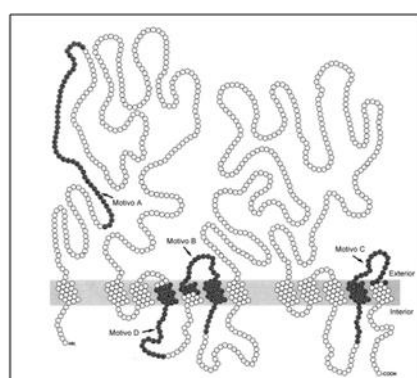


Figura 6. Modelo estrutural dos transportadores pertencentes à família RND. Adaptado de (94).

– **Família “Multidrug and Toxic Compound Extrusion”**

Ao contrário dos restantes transportadores activos secundários (famílias MFS, RND e SMR), que actuam por meio de antiporte de prótons/compostos, as bombas de efluxo da família MATE utilizam principalmente o gradiente de iões sódio, funcionando com o antiporte de sódio/compostos, podendo utilizar também a FMP. As proteínas da família MATE são compostas por aproximadamente 450 resíduos de aminoácidos com 12 segmentos transmembranares (10, 65).

1.3.2 Sistemas de efluxo em *S. aureus*

Até à data, já foram descritas várias bombas de efluxo em *S. aureus*. A maior parte destas bombas pertence à MFS, nomeadamente as bombas codificadas em plasmídeos como a QacA/B e as codificadas no cromossoma NorA, NorB, NorC, MdeA e SdrM.

Embora estas bombas demonstrem diferentes especificidades de substratos, a maior parte é capaz de extrusar compostos de diferentes classes químicas. As bombas de efluxo MDR codificadas no cromossoma podem conferir susceptibilidade reduzida tanto a antibióticos como a biocidas, enquanto as codificadas em plasmídeos geralmente conferem susceptibilidade reduzida apenas a biocidas (90).

1.3.2.1 Sistemas de efluxo codificados em plasmídeos

Os sistemas de efluxo codificados em plasmídeos são geralmente sistemas de efluxo específicos. No entanto em *S. aureus*, alguns destes sistemas de efluxo são MDR, sendo responsáveis pela extrusão de anti-sépticos e desinfetantes catiónicos como QACs, brometo de etídeo e clorexidina (Tabela 3) (10, 85, 86).

Tabela 3. Sistemas de efluxo codificados em plasmídeos em *S. aureus* (7, 38, 85).

Sistemas de efluxo	Família	Regulador	Compostos antimicrobianos extrusados
Sistemas MDR			
QacA/B	MFS	QacR	Compostos catiónicos monovalentes (QacA/B) e divalentes (QacA)
Smr	SMR		QACs, brometo de etídeo
QacG/QacH/QacJ	SMR		QACs, brometo de etídeo
Sistemas específicos			
Tet(K), Tet(L)	MFS		Tetraciclínas
Msr(A)	ABC		Macrólidos e estreptograminas tipo B
Vga (A/B)	ABC		Estreptograminas tipo A

De entre os sistemas de efluxo específicos codificados em plasmídeos encontram-se as bombas de efluxo Tet(K) e Tet(L), uma família de bombas de efluxo responsáveis pela extrusão de antibióticos da classe das tetraciclínas, pertencentes à MFS (98, 99). A bomba Msr(A), pertencente à família ABC contribui para a resistência a macrólidos e a estreptograminas do tipo B em diferentes espécies de estafilococos (97, 101). As bombas de efluxo Vga(A) e Vga(B) são duas bombas de efluxo da família ABC, codificadas em plasmídeos e transposões, que têm sido descritas em várias espécies de estafilococos e que conferem resistência a estreptograminas do tipo A (15).

– Sistemas de efluxo QacA/B e Smr

A resistência, em *S. aureus*, a compostos desinfetantes e anti-sépticos, incluindo corantes (acriflavina, brometo de etídeo), QACs (cloreto de benzalcónio) e biguanidinas (clorexidina) deve-se principalmente a três determinantes de resistência designados por *qacA*, *qacB* e *smr*, codificados por plasmídeos. Estes determinantes variam na sua capacidade de conferir resistência a uma variedade de catões orgânicos tóxicos (Tabela 4) (84, 94, 103, 112).

Tabela 4. Determinantes *qacA*, *qacB* e *smr* e resistência a compostos de amônio quaternário (QACs) e outros biocidas (69, 103).

Determinante	Localização do gene	Resistência a biocidas
<i>qacA</i>	Plasmídeos multirresistentes da família pSK1; plasmídeos de resistência a metais pesados e por β -lactamases	QACs, diamidinas, biguanidinas, corantes
<i>qacB</i>	Plasmídeos de resistência a metais pesados e por β -lactamases	QACs, corantes
<i>smr</i>	Plasmídeos pequenos (< 3 Kb) ou plasmídeos conjugativos de maior tamanho	QACs e brometo de etídeo

QacA

O gene *qacA*, de 1.542 pb, localizado em plasmídeos de *S. aureus*, codifica para uma proteína membrana, QacA, pertencente à MFS, constituída por 514 aminoácidos e com tamanho aproximado de 55 kDa (11, 112). Esta proteína está organizada em 14 segmentos transmembranares, proporcionando resistência através de um mecanismo de antiporte dependente de FMP (72, 84, 90, 94).

O determinante *qacA* é geralmente transportado em plasmídeos de grande tamanho (> 20 Kb) (86, 106), e encontra-se predominantemente em plasmídeos de multirresistência da família pSK1, sendo também associado a plasmídeos que codificam resistência a antibióticos β -lactâmicos e a metais pesados (56, 57, 63, 106).

A proteína de transporte QacA interage directa e especificamente com os seus substratos (72), sendo estes compostos antimicrobianos ideais uma vez que a sua carga positiva atrai-os para o interior das células bacterianas carregadas negativamente (34). A presença de um aminoácido com carga negativa na posição 34 do segmento transmembranar 1 e de uma arginina na posição 114 no segmento transmembranar 4 são essenciais para o transporte mediado por QacA (11).

QacA medeia a resistência de mais de 30 compostos antimicrobianos catiónicos lipofílicos pertencentes a 12 famílias químicamente distintas. QacA confere resistência a uma ampla variedade de catiões antimicrobianos orgânicos monovalentes, incluindo diversos corantes (brometo de etídeo), QACs (cetrimida, cloreto de benzalcónio); e catiões orgânicos divalentes como a propamidina, a clorexidina e diamidinas (68, 72,

94). No entanto, não foi observada a resistência a compostos catiónicos trivalentes ou a compostos aniônicos (11).

A extrusão mediada por QacA é competitivamente inibida por catiões monovalentes e não competitivamente inibida por catiões divalentes. Isto sugere que QacA contém diferentes locais de ligação para catiões monovalentes e catiões divalentes (11, 72, 94).

A expressão do gene *qacA* é regulada pela proteína repressora QacR, composta por 188 aminoácidos. QacR, pertence à família das proteínas repressoras transcricionais TetR, que possuem um domínio “helix-turn-helix” de ligação ao DNA nas suas extremidades N-terminal, mas que codificam C-terminais diferentes envolvidos na ligação de compostos indutores. QacR liga-se especificamente a uma repetição invertida IR1, identificada como a região operadora de *qacA* que se situa a montante da sequência promotora de *qacA* (P_{qacA}), prevenindo a transcrição do gene (11, 78, 85, 94).

A expressão de *qacA* é induzida por vários substratos de QacA, como o brometo de etídeo e o cloreto de benzalcónio, que interagem directamente com a QacR, inibindo a sua ligação ao P_{qacA} , resultando na transcrição de *qacA* (85, 113). Na ausência de substratos de QacA, QacR liga-se a IR1 e reprime a transcrição de *qacA* (34).

O efluxo mediado por QacA demonstrou ser sensível aos inibidores de bombas de efluxo, reserpina e verapamil (72).

QacB

O produto do gene *qacB* é uma proteína membrana, QacB, muito semelhante a QacA, pertencente à MFS e com 14 segmentos transmembranares. O gene *qacB* tem sido detectado em plasmídeos de maior tamanho que conferem resistência a metais pesados, como o pSK23 (68, 86, 103).

QacB, assim como QacA, confere elevada resistência a catiões monovalentes, contudo difere de QacA uma vez que confere níveis baixos, ou nulos, de resistência a compostos catiónicos divalentes (11, 72, 84, 94). A expressão do gene *qacB* é regulada pelo mesmo mecanismo de regulação de *qacA*, através do repressor QacR. Estudos de análise de sequências detectaram que *qacA* e *qacB* diferem em apenas sete nucleótidos (11, 68, 86). Estudos de mutagénese revelaram que a diferença na especificidade do substrato entre QacA e QacB se deve a uma única substituição do aminoácido aspartato

na posição 323 do segmento transmembranar 10 de QacA pelo aminoácido alanina em QacB (3, 68, 85, 86). O aminoácido aspartato demonstrou ser essencial para conferir reconhecimento e consequentemente elevados níveis de resistência a catiões divalentes, sugerindo que esta região pode formar parte de um local de ligação de elevada afinidade para catiões divalentes em QacA. Uma mutação nesse aminoácido pode inibir a resistência a estes compostos (72, 94). No entanto, estes dois transportadores, QacA e QacB, partilham afinidades de ligação semelhantes e locais de ligação idênticos para catiões monovalentes (11).

O determinante *qacB* tem sido identificado em plasmídeos de *S. aureus* isolados desde 1950, enquanto *qacA* só foi detectado em estirpes de estafilococos isoladas a partir de 1980 (11). Este facto sugere que o uso intensivo de catiões divalentes em ambientes hospitalares poderá ter conduzido à evolução da *qacA* a partir de *qacB*, por aquisição de um local de ligação de elevada afinidade para catiões divalentes (72, 94). Este processo evolutivo poderá ter ocorrido em espécies de estafilococos ou num hospedeiro bacteriano desconhecido com consequente transferência horizontal para espécies de estafilococos (11).

Smr

A bomba de efluxo Smr (também designada por QacC, QacD ou Ebr) é codificada pelo gene *smr* de 321 pb, e pertence à família SMR, sendo responsável por níveis de baixa resistência a moléculas hidrofóbicas e catiónicas, entre elas corantes aromáticos como o brometo de etídeo e QACs como o cloreto de benzalcónio (33, 84, 91, 94).

O gene *smr* foi o primeiro gene da família SMR a ser identificado e tem sido detectado em plasmídeos conjugativos de maior tamanho (> 20 Kb) e em plasmídeos não-conjugativos de pequeno tamanho (< 3 Kb) de isolados clínicos de *S. aureus* e outros estafilococos (57, 68, 84, 94, 118).

A proteína Smr possui uma cadeia polipeptídica curta, com 107 aminoácidos, dispondo de quatro domínios transmembranares putativos (34, 84). Devido ao seu pequeno tamanho, não se sabe se funciona como uma proteína de transporte independente, ou se interage com outras proteínas de membrana para a extrusão de compostos das células (34).

Estudos de mutagénese dirigida têm investigado o papel do aminoácido conservado glutamato no segmento transmembranar 1 da Smr, uma vez que substituições conservativas, como a substituição de glutamato pelo aminoácido aspartato, podem impedir efectivamente a actividade do sistema de efluxo. Isto indica que este resíduo pode estar directamente envolvido no processo de efluxo de múltiplos compostos, na ligação do substrato e/ou na troca de compostos por protões (33, 94).

– **Outros sistemas de efluxo Qac**

A resistência a compostos QACs mediada por bombas de efluxo codificadas pelos determinantes *qac*, que não *qacA/B* ou *smr*, tem sido descrita em isolados de estafilococos da indústria alimentar e de estirpes veterinárias (7, 37, 38). Só muito recentemente, foram identificados os primeiros isolados de *S. aureus* de origem clínica humana com estes genes, sendo a sua frequência muito baixa, quando comparados com os genes *qacA*, *qacB* e *smr* (126).

QacG

O gene *qacG*, encontrado em plasmídeos de isolados de *S. aureus* recolhidos na indústria alimentar, e mais recentemente, em isolados clínicos humanos de *S. aureus* (126) codifica para a bomba de efluxo QacG de 107 aminoácidos. Este gene é normalmente transportado em plasmídeos de pequeno tamanho (< 3 Kb), à semelhança do gene *smr* (38).

A bomba de efluxo QacG apresenta 69,2% de identidade com a Smr, pertencendo à família SMR. Esta bomba confere resistência a QACs e brometo de etídio (38).

QacH

O gene *qacH*, encontrado inicialmente num plasmídeo de *S. saprophyticus* codifica para a bomba de efluxo QacH que apresenta similaridades com as bombas da família SMR. Este gene é normalmente transportado em plasmídeos de pequeno tamanho (< 3

Kb) (37), tendo sido detectada num estudo recente a sua presença em isolados clínicos humanos de *S. aureus* (126).

A bomba de efluxo QacH apresenta 107 aminoácidos e partilha 78% de identidade com a bomba Smr. Na transformação de *S. aureus* com o gene *qacH* foi demonstrado que a bomba QacH confere uma resistência mais alargada a QACs do que as bombas Smr e QacG (37).

QacJ

O gene *qacJ* codifica para a bomba de efluxo QacJ, que à semelhança das bombas QacG e QacH, possui 107 aminoácidos pertencendo à família SMR. A QacJ apresenta elevada identidade com Smr (72,5%), QacG (82,6%) e QacH (73,4%) e confere resistência a QACs (7).

O gene *qacJ* foi encontrado inicialmente apenas em estirpes de *S. aureus*, *S. simulans* e *S. intermedius* de origem veterinária. Contudo, um estudo recente demonstrou a presença deste gene em isolados clínicos humanos de *S. aureus* (126).

1.3.2.2 Sistemas de efluxo codificados no cromossoma

A maior parte dos sistemas de efluxo codificados no cromossoma de *S. aureus* descritos até à data são bombas de efluxo MDR, nomeadamente NorA, NorB, NorC, MdeA, MepA, SdrM e SepA. No entanto, foram também já descritos duas bombas de efluxo específicas, Tet38 e AbcA, cujos determinantes estão localizados no cromossoma de *S. aureus* (Tabela 6) (75, 89, 124).

Tabela 5. Sistemas de efluxo codificados no cromossoma de *S. aureus* (75, 89, 124).

Sistemas de efluxo	Família	Reguladores ^(a)	Compostos antimicrobianos extrusados
Sistemas MDR			
NorA	MFS	MgrA, NorG?	Fluoroquinolonas hidrofílicas, QACs, diamidinas, biguanidinas, corantes
NorB	MFS	MgrA, NorG	Fluoroquinolonas hidrofílicas e hidrofóbicas, tetraciclina, brometo de etídeo
NorC	MFS	MgrA, NorG?	Fluoroquinolonas hidrofílicas e hidrofóbicas
SepA	Por identificar		Biguanidinas, QACs, corantes
MdeA	MFS		Macrólidos, QACs, corantes
MepA	MATE	MepR	Fluoroquinolonas hidrofílicas, gliciliclinas, QACs, corantes
SdrM	MFS		Norfloxacina, brometo de etídeo
Sistemas específicos			
Tet38	MFS	MgrA	Tetraciclina
AbcA	ABC	NorG?	β-lactâmicos

^(a) O papel do regulador NorG permanece por esclarecer nos sistemas de efluxo NorA e NorC.

– Sistemas de efluxo NorA, NorB e NorC

O efluxo de quinolonas tem sido descrito em diferentes espécies bacterianas. Em *S. aureus*, a resistência a fluoroquinolonas mediada por efluxo tem sido associada às bombas MDR NorA, NorB e NorC (24, 90).

NorA

A proteína NorA foi a primeira bomba de efluxo MDR cromossômica descrita, tendo sido identificada num isolado clínico de *S. aureus* resistente à norfloxacina (117). Esta proteína tem origem num gene cromossômico que ocorre naturalmente no genoma de *S. aureus* (45). A sequenciação e caracterização do gene *norA* revelaram que NorA é uma proteína membrana com 388 aminoácidos e 42,3 kDa, que pertence à MFS, sendo composta por 12 segmentos transmembranares (94).

A bomba de efluxo NorA confere resistência a fluoroquinolonas hidrofílicas (norfloxacin e ciprofloxacin), e a compostos lipofílicos e monocatiónicos como o brometo de etídeo, a cetrimida, o cloreto de benzalcónio e a acriflavina (46, 85).

NorB

A bomba de efluxo MDR NorB, codificada pelo gene *norB*, é constitída por 463 aminoácidos e tem um tamanho de 49 kDa, pertence à MFS, sendo composta por 12 segmentos transmembranares (114). A bomba de efluxo NorB partilha 30% de similaridade com NorA e de 31% com MdeA (114).

Quando sobreexpressa, NorB induz um aumento da resistência a quinolonas e corantes, também substratos de NorA, como a norfloxacin, o brometo de etídeo e a cetrimida. No entanto, NorB também confere resistência à sparfloxacin e à moxifloxacin, fluoroquinolonas de carácter hidrofóbico que não são substratos de NorA. Esta bomba está ainda associada à resistência de baixo nível à tetraciclina (114).

NorC

A bomba de efluxo MDR NorC, codificada pelo gene *norC*, apresenta 61% identidade com NorB (115). Esta bomba contribui para a resistência a quinolonas, incluindo as fluorquinolonas hidrofóbicas moxifloxacin e sparfloxacin (115).

– Sistema de efluxo SepA

A bomba de efluxo SepA, codificada pelo gene *sepA*, confere baixa resistência a anti-sépticos e corantes (75). A sequência de aminoácidos de SepA, demonstrou não haver qualquer homologia significativa com os genes determinantes de multirresistência anteriormente descritos. A análise da hidrofobicidade de SepA sugere que esta proteína possui quatro segmentos transmembranares, à semelhança das proteínas da família SMR. No entanto, a bomba SepA não possui os motivos conservados presentes nessa família, sugerindo que poderá integrar uma nova família de transportadores (75).

– **Sistema de efluxo MdeA**

A MdeA é uma bomba de efluxo MDR, codificada pelo gene *mdeA*, composta por 479 aminoácidos que pertence à MFS, apresentando 14 segmentos transmembranares (42). Esta bomba de efluxo confere resistência a vários compostos QAC e antibióticos como o ácido fusídico, a novobiocina e a mupirocina, mas não a fluoroquinolonas (42, 114).

– **Sistema de efluxo MepA**

MepA, codificada pelo gene *mepA*, foi a primeira bomba de efluxo MDR da família MATE a ser identificada em *S. aureus* (48). Esta bomba de efluxo confere resistência a vários biocidas monovalentes e divalentes, como a pentamidina, o brometo de etídeo, o cloreto de dequalínio e a clorexidina e às fluoroquinolonas norfloxacin e ciprofloxacina (48).

– **Sistema de efluxo SdrM**

SdrM é uma bomba de efluxo MDR, codificada pelo gene *sdrM*, pertencente à MFS, com 14 segmentos transmembranares (124). Esta bomba apresenta similaridades com outras bombas de efluxo MDR em *S. aureus*, nomeadamente NorB (23%) e QacA (21%) (124). A SdrM confere resistência a vários compostos antimicrobianos como a norfloxacin, a acriflavina e o brometo de etídeo (124).

– **Sistema de efluxo Tet38**

Tet38, codificada pelo gene *tet38*, pertence à família de bombas de efluxo de tetraciclina já discutidas anteriormente. Esta bomba de efluxo apresenta 450 aminoácidos e pertence à MFS, sendo composta por 14 segmentos transmembranares. Tet38 apresenta 26% identidade com Tet(K) e 25% identidade com Tet(L) (114). A

sobreexpressão de *tet38* induz resistência à tetraciclina mas não à minociclina e a outros compostos (114).

– Sistema de efluxo AbcA

AbcA é uma bomba de efluxo da família ABC, que utiliza a energia libertada pela hidrólise de ATP. Este transportador, codificado pelo determinante *abcA*, partilha uma região promotora sobreposta com o gene estrutural *pbpD* que codifica a proteína PBP4, uma transpeptidase/carboxipeptidase envolvida na síntese da parede celular, e foi sugerido que possa contribuir para uma diminuição da sensibilidade aos β -lactâmicos (116).

1.4 Métodos de avaliação da actividade de efluxo

Uma vez que os sistemas de efluxo de múltiplos compostos constituem um factor chave no aparecimento de multirresistência, foram desenvolvidos vários métodos de avaliação da actividade destes sistemas em células bacterianas. Alguns desses métodos consistem na utilização de substratos marcados com compostos radioactivos ou fluorescentes ou na determinação da concentração mínima inibitória (CMI) para diferentes substratos, na presença e ausência de compostos descritos como inibidores de efluxo (IEs) (83).

Os métodos actualmente utilizados para a avaliação da actividade de efluxo através da determinação de CMI são aqueles que avaliam a redução de CMI de um dado substrato/antibiótico de bombas de efluxo ou de conjunto de substratos/antibióticos quando o IE está presente no meio. Estes IEs podem causar um depleção de energia, pela inibição da ligação de ATP ou por desregular a FMP (gradiente de protões) (65), o que conduz à inibição do efluxo presente nas células e por consequente, redução de CMI. No entanto, estes métodos são muitas vezes exaustivos e dispendiosos, estando também muito dependentes da sensibilidade de um determinado sistema de efluxo ao inibidor em questão, o qual pode variar bastante (21, 30, 83).

Alguns dos compostos utilizados como inibidores de efluxo incluem a planta alcalóide reserpina (65); as fenotiazinas tioridazina e clorpromazina (agentes neurolépticos e antieméticos), antagonistas dos receptores de dopamina e inibidores de calmodulina que actuam como IEs através da disrupção energética da membrana (47, 53, 65) e o verapamil, antagonista de canais de cálcio (65).

Dadas as limitações da determinação do efeito de um determinado composto nas CMIs de substratos de bombas de efluxo, tem-se procurado desenvolver outros métodos, que permitam avaliar o efluxo de uma determinada molécula, em várias condições. Estes métodos alternativos recorrem geralmente ao uso de moléculas fluorescentes, que servem como substrato extrusado. Recentemente, foi desenvolvido um método semi-automático fluorimétrico para a avaliação da actividade de bombas de efluxo em células bacterianas. Este método utiliza o substrato brometo de etídeo, um substrato da maioria das bombas de efluxo bacterianas, como marcador visual da actividade de efluxo, na presença e na ausência de IEs com auxílio de detectores de fluorescência (83, 120).

1.5 Objectivos desta Dissertação

Staphylococcus aureus é um importante agente patogénico, tanto na comunidade como a nível hospitalar, ao qual se encontra associado um elevado número de casos de resistência e multirresistência a compostos antimicrobianos, incluindo antibióticos e biocidas. Dentro dos diferentes mecanismos de resistência a estes compostos em *S. aureus*, a resistência mediada por bombas de efluxo é a menos bem caracterizada e por isso constitui o tema desta Dissertação. Para isso, foram estudadas as bombas de efluxo QacA e Smr, codificadas em plasmídeos, em duas estirpes MRSA de origem hospitalar, SM39 e SM52. Estas estirpes já tinham sido preliminarmente caracterizadas num estudo anterior (27), tendo-se verificado que apresentavam os determinantes para as bombas de efluxo QacA e Smr, respectivamente. Nesta Dissertação, procurou-se estudar o efeito e a importância da presença destes genes/bombas nestas estirpes, de forma a observar se o perfil de multirresistência, em particular de resistência a biocidas apresentado por cada estirpe se deve ou não à bomba de efluxo em estudo.

2 Material e Métodos

2.1 Material

2.1.1 Estirpes bacterianas

Para o estudo das bombas de efluxo QacA e Smr foram utilizadas duas estirpes de *S. aureus* de origem clínica, SM39 e SM52, previamente descritas (27). Tratam-se de duas estirpes MRSA, isoladas no Laboratório de Microbiologia de um hospital de Lisboa entre Fevereiro e Março de 2007. A estirpe SM39 apresenta o determinante para a bomba de efluxo QacA, o gene *qacA*, codificado num plasmídeo de cerca de 35 Kb, denominado pSM39. A estirpe SM52 possui o determinante para a bomba de efluxo Smr, o gene *smr*, codificado num plasmídeo de tamanho de 2,8 Kb, designado por pSM52 (21).

Neste trabalho foram também utilizadas as estirpes de referência *S. aureus* subsp. *aureus* Rosenbach ATCC25923 e *S. aureus* RN4220. A estirpe ATCC25923 foi utilizada neste trabalho como referência na determinação de CMIs e na determinação da actividade de efluxo dos isolados clínicos. A estirpe RN4220 possui um defeito parcial nos sistemas de restrição (52, 74), tendo sido utilizada como estirpe receptora do plasmídeo pSM52 por electrotransformação. O conjunto de estirpes estudadas nesta Dissertação é apresentado na Tabela 6.

Tabela 6. Estirpes de *S. aureus* utilizadas nesta Dissertação.

Estirpe	Características mais relevantes
ATCC25923	Estirpe de referência, susceptível a antibióticos (estirpe controlo)
RN4220	Estirpe de referência, deficiente nos sistemas de restrição, receptora de plasmídeo (estirpe controlo)
SM39	Isolado clínico, MRSA, possui um plasmídeo com o determinante <i>qacA</i> (pSM39)
SM39 curada	Estirpe SM39 curada do plasmídeo pSM39
SM52	Isolado clínico, MRSA, possui um plasmídeo com o determinante <i>smr</i> (pSM52)
RN4220:pSM52	Estirpe RN4220 electrotransformada com o plasmídeo pSM52

2.1.2 Meios de cultura, enzimas e soluções

A composição e o modo de preparação dos meios de cultura, soluções e enzimas utilizadas ao longo deste trabalho encontram-se descritos nas Tabelas 7 a 12. Todos os meios de cultura e soluções tampão foram preparados em água bidestilada, e quando necessário, esterilizados por autoclavagem a 121 °C durante 15 minutos, à excepção da solução de glicerol a 50% (v/v), que foi autoclavada a 110°C.

As enzimas e soluções de inibidores de efluxo, biocidas e corantes e de antibióticos foram filtrados com filtros de seringa estéreis de PVDF com 0,22 µm de diâmetro de poro (Rotilabo ® Spritzenfilter Steril, Karlshure, Alemanha).

Tabela 7. Composição dos meios de cultura utilizados.

Meio de Cultura	Composição (por litro)
Tryptone soya broth (TSB) ⁽¹⁾	17 g peptona de caseína; 3 g peptona de soja; 5 g NaCl, 2,5 g K ₂ HPO ₄ ; 2,5 g glucose; pH 7,3 ± 0,2 a 25°C
Tryptone soya agar (TSA) ⁽¹⁾	TSB; 15 g agar; pH 7,3 ± 0,2 a 25°C
Mueller-Hinton broth (MHB) ⁽¹⁾	300 g infusão desidratada de carne; 17,5 g de caseína hidrolisada; 1,5 g amido; 4,347 mg Ca ²⁺ ; 6,206 mg Mg ²⁺ ; pH 7,3 ± 0,1 a 25°C
Mueller-Hinton agar (MHA) ⁽¹⁾	MHB; 15 g agar; pH 7,3 ± 0,2 a 25°C
Penassay broth (PB) ⁽²⁾	5 g peptona de gelatina; 1,5 g extracto de levedura; 1,5 g extracto de bife; 3,5 g NaCl; 1 g dextrose; 3,68 g K ₂ HPO ₄ ; 1,32 g KH ₂ PO ₄ ; pH 7 ± 0,2 a 25°C
Penassay agar (PA) ⁽²⁾	PB; 15 g agar; pH 7,3 ± 0,2 a 25°C
SMM 2X ^{(1) (*)}	1 M sucrose; 0,04 M maleato; 0,04 M MgCl ₂ ; pH 6,5
SMMP	Penassay broth 2X + SMM (mistura 1:1 de Penassay broth 4X + SMM 2X)

⁽¹⁾ Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra; ⁽²⁾ BD, Franklin Lakes, NJ, E.U.A; * filtrado.

Tabela 8. Enzimas utilizadas.

Enzima⁽¹⁾	Composição/Preparação da solução “stock”
RNase	10 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida em alíquotas a -20°C
Lisozima	10 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida em alíquotas a -20°C
Lisostafina	15 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida em alíquotas a -20°C
Proteinase K	10 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida em alíquotas a -20°C

⁽¹⁾ Sigma-Aldrich, St.Louis, E.U.A.

Tabela 9. Composição e modo de preparação de soluções tampão utilizadas.

Solução	Composição⁽¹⁾
SET	20 mM Tris-HCl; 50 mM EDTA; 20% (p/v) sucrose; pH 7,0
PIV	10 mM Tris pH 8,0; 1M NaCl
EC	6 mM Tris pH 8,0; 1 M NaCl ⁽²⁾ ; 100 mM EDTA pH 8,0; 0,2% (p/v) deoxicolato de sódio; 0,5 % (p/v) laurilsarcosina de sódio ⁽³⁾ ; 50 µg/mL RNase; 100 µg/mL lisozima; 50 µg/mL lisostafina
ESP	0,25 M EDTA pH 9,0; 1% (p/v) laurilsarcosina de sódio; 1 mg/mL proteinase K
TE 1X	10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0
PBS 1X	10 mM tampão fosfato; 2,7 mM KCl; 137 mM NaCl, pH 7,4
TAE 1X	40 mM Tris-acetato; 1mM EDTA, pH 8,0 (Preparada solução “stock” a 50X)
TBE 0,5X	1 M Tris; 1 M ácido bórico; 20 mM EDTA; pH 8,3 Solução “stock” a 10X ⁽⁴⁾
Solução de lise I	5 mg/mL RNase; 1,5 mg/mL lisostafina Dissolvido em tampão SET
Solução de lise II	1 % (p/v) SDS; 0,2 N NaOH ⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Sigma; ⁽²⁾ Panreac, Barcelona, Espanha; ⁽³⁾ Usb Corporation, Cleveland, OH E.U.A.; ⁽⁴⁾ Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, C.A., E.U.A.; ⁽⁵⁾ Merck, Darmstadt, Alemanha.

Tabela 10. Composição e modo de preparação de soluções de inibidores de efluxo utilizadas.

Solução⁽¹⁾	Composição/Preparação da solução “stock”
Tioridazina (TZ)	10 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
Clorpromazina (CPZ)	10 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
Verapamil (VER)	20 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
Reserpina (RES)	20 mg/mL em 100% DMSO ⁽²⁾ Mantida a -20°C
Promazina (PZ)	10 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a -20°C

⁽¹⁾ Sigma; ⁽²⁾ Merck.

Tabela 11. Composição e modo de preparação de soluções de biocidas e corantes utilizadas.

Solução	Composição/Preparação da solução “stock”
Brometo de etídeo (EtBr) ⁽¹⁾	10 mg/mL em água bidestilada estéril (Δ) Mantida ao abrigo da luz e a 4°C
Violeta de cristal (CV) ⁽¹⁾	1 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a 4°C
Acriflavina (ACR) ⁽¹⁾	100 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a 4°C
Brometo de tetrafenilfosfato (TPP) ⁽¹⁾	50 mg/mL em água bidestilada estéril (Δ) Mantida a -20°C
Cloreto de benzalcónio (BAC) ⁽¹⁾	10 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
Cetrimida (CET) ⁽²⁾	10 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
Brometo de hexadeciltrimetilamónio (CTAB) ⁽³⁾	10 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
Pentamidina (PT) ⁽¹⁾	10 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
Cloreto de dequalínio (DC) ⁽¹⁾	5 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
Clorexidina (CHX) ⁽³⁾	1 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
Cloreto de cetilpiridínio (CPC) ⁽¹⁾	10 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
Berberina (BERB) ⁽¹⁾	10 mg/mL em água bidestilada estéril (Δ) Mantida a -20°C

⁽¹⁾ Sigma; ⁽²⁾ Maialab, Fânzeres, Portugal; ⁽³⁾ Fluka, Chemie GmbH, Buchs, Suíça; Δ: necessário aquecimento para dissolução completa.

Tabela 12. Composição e modo de preparação de soluções de antibióticos utilizadas.

Solução	Composição/Preparação da solução “stock”
Norfloxacina (NOR) ⁽²⁾	1 mg/mL em 50% (v/v) 0,1 M NaOH (água bidestilada estéril) Diluição em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
Ciprofloxacina (CIP) ⁽²⁾	1 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
Eritromicina (ERY) ⁽¹⁾	10 mg/mL em etanol ⁽³⁾ a 95% Diluição em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
Cloranfenicol (CHL) ⁽¹⁾	1 mg/mL em etanol a 95% Diluição em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
Novobiocina (NOV) ⁽¹⁾	50 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
Oxacilina (OXA) ⁽¹⁾	20 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
Tetraciclina (TET) ⁽¹⁾	1 mg/mL em etanol a 95% Diluição em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
Gentamicina (GEN) ⁽¹⁾	1 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
Canamicina (KAN) ⁽¹⁾	20 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
Penicilina (PEN) ⁽¹⁾	20 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
Ampicilina (AMP) ⁽¹⁾	20 mg/mL em tampão fosfato pH 8,0 a 0,1 M Diluição em tampão fosfato pH 6,0 a 0,1 M Mantida a -20°C
Sparfloxacina (SPX) ⁽²⁾	20 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
Levofloxacina (LEV) ⁽¹⁾	20 mg/mL em 50% (v/v) 0,1 M NaOH (água bidestilada estéril) Diluição em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
Vancomicina (VAN) ⁽¹⁾	1 mg/mL em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
Trimetoprim (TMP) ⁽²⁾	10 mg/mL em 10% (v/v) 0,05 M HCl (água bidestilada estéril) (Δ) Diluição em água bidestilada estéril Mantida a -20°C

⁽¹⁾ Sigma; ⁽²⁾ Fluka; ⁽³⁾ Panreac; Δ: necessário aquecimento para dissolução completa.

2.1.3 Outro material biológico

Na análise de produtos de reacção de polimerase em cadeia (PCR, de “polimerase chain reaction”) e de extracção de DNA plasmídico por electroforese foram utilizados os marcadores 100 bp DNA Ladder Plus Gene Ruler (Fermentas International Inc., Ontário, Canadá) e 1 Kb DNA Ladder Gene Ruler (Fermentas), respectivamente. O marcador lambda Ladder PFGE (Biolabs Inc., Ipswich, MA, E.U.A) foi usado como marcador nos ensaios de electroforese em campo pulsado (PFGE, de “pulsed field gel electrophoresis”).

Os “primers” utilizados na caracterização genética das estirpes por PCR encontram-se descritos na Tabela 13.

Tabela 13. Sequências nucleotídicas dos “primers” utilizados neste trabalho e tamanho esperado do amplificação, em pares de bases (pb).

“Primers” ⁽¹⁾	Sequência nucleotídica (5' - 3')	Amplicação (pb)	Referência
SMR_Fw	ATAAGTACTGAAGTTATTGGAAGT	285	6
SMR_Rv	TTCCGAAAATGTTTAACGAAACTA		
QacA/B_Fw	GCTGCATTTATGACAATGTTTG	628	3
QacA/B_Rv	AATCCACCTACTAAAGCAG		

⁽¹⁾ Invitrogen, Escócia, Reino Unido.

2.2 Métodos

2.2.1 Crescimento e manutenção das estirpes bacterianas

Todas as estirpes em estudo foram cultivadas a 37°C, em “tryptone soya broth” (TSB) numa estufa com agitação (Thermo Scientific MaxQ* 4000 Benchtop Orbital Shakers, Waltham, MA, E.U.A) ou em “tryptone soya agar” (TSA), à excepção de quando indicado nos protocolos em que foram necessárias outras condições de crescimento.

Foram mantidos “stocks” de culturas em meio líquido, suplementado com 10% (v/v) de glicerol (Sigma), a -80°C (Nuaire Ultralow Freezer, Plymouth, Minnesota, USA).

2.2.2 Processos de cura do plasmídeo das estirpes SM39 e SM52

As estirpes SM39 e SM52 apresentam os genes que codificam as bombas de efluxo QacA e Smr, respectivamente, em plasmídeos. Para estudar estas bombas, procedeu-se inicialmente ao processo de cura do plasmídeo de cada uma das estirpes em estudo, tendo sido testado vários métodos de cura.

A monitorização da cura dos plasmídeos pSM39 e pSM52 ao longo dos vários métodos foi realizada através do plaqueamento das culturas em meio sólido suplementando com brometo de etídeo (EtBr). O EtBr é um substrato de largo-espectro de bombas de efluxo (67, 119, 120), sendo utilizado como um primeiro indicador de actividade de efluxo, através da maior ou menor emissão de fluorescência de cultura em placa. Ao entrar nas células, o EtBr proporciona um aumento da fluorescência emitida pela cultura. As células que apresentam pouca actividade de efluxo não serão capazes de extrusar o EtBr, aumentando a sua concentração intracelular e consequentemente produzindo fluorescência rosa quando observadas à luz ultravioleta. Por outro lado, as células com maior capacidade de efluxo serão capazes de extrusar o EtBr, sendo necessárias concentrações mais elevadas de EtBr para a detecção de fluorescência (67, 119, 120). Dado que o EtBr é substrato das duas bombas de efluxo em estudo, QacA e Smr, este método foi utilizado para avaliar os processos de cura de plasmídeos, já que as colónias que apresentem maior fluorescência em meio suplementado com EtBr corresponderão provavelmente às que perderam o plasmídeo com o gene *qacA* ou *smr*.

A análise de colónias fluorescentes foi realizada através da extracção de DNA plasmídico e detecção dos genes *qacA* (SM39) e *smr* (SM52) por PCR.

2.2.2.1 Cura do plasmídeo pSM39

– Crescimento na presença de concentrações subinibitórias crescentes de CPZ

No processo de cura do plasmídeo pSM39 foram realizadas várias passagens sucessivas da estirpe SM39 na presença de concentrações crescentes de clorpromazina (CPZ) (20). A gama de concentrações de CPZ utilizada foi escolhida de acordo com o valor de CMI para a estirpe SM39 e corresponde a valores subinibitórios (i.e., inferiores a $\frac{1}{2}$ de CMI).

A partir de uma cultura da estirpe SM39 em placa de TSA, inocularam-se 5 mL de meio TSB fresco e incubou-se com agitação a 37°C durante a noite (Passagem 0). Da cultura resultante foi transferido para 5 mL de meio TSB suplementado com CPZ (2 mg/L) um inóculo correspondente a 1% (v/v) (Passagem 1), sendo realizadas passagens sucessivas com TSB suplementado com CPZ em incrementos de 2 mg/L, até uma concentração de 14 mg/L (Passagem 7). Todas as culturas foram incubadas a 37°C com agitação, durante a noite.

De forma a avaliar o efeito de cura foi estudada a capacidade de efluxo de cada cultura. Foi retirada uma alíquota de 100 μ L de cada cultura e foram feitas diluições seriadas em PBS, plaqueando-se as diluições de 10^{-5} a 10^{-7} em TSA suplementado com 2,5 mg/L de EtBr. As placas foram incubadas a 37°C durante a noite, sendo depois observada a fluorescência das colónias à luz ultravioleta (UV) de um transiluminador (Uvitec, Cambridge, Reino Unido). As colónias que apresentaram um aumento de fluorescência foram inoculadas individualmente em 5 mL de meio TSB fresco e incubadas a 37°C durante a noite. Foram também preparadas culturas a partir de colónias não fluorescentes, para servirem de controlo, sendo realizada a sua análise posteriormente conforme descrito no ponto 2.2.2.

2.2.2.2 Cura do plasmídeo pSM52

– Crescimento na presença de concentrações crescentes de CPZ, NOV e PZ

No processo de cura do plasmídeo pSM52 foram realizadas várias passagens sucessivas da estirpe na presença de concentrações crescentes de CPZ, novobiocina (NOV) e promazina (PZ) (20, 37), conforme descrito no ponto 2.2.2.1. As culturas foram incubadas a 37°C com agitação durante a noite, e assim sucessivamente para todas as passagens, aumentando a cada passagem a concentração de CPZ em incrementos de 4 mg/L e de NOV e PZ em incrementos de 10 mg/L.

A gama de concentrações utilizada para cada um dos compostos foi escolhida de acordo com o valor de CMI obtida para a estirpe SM52, tendo sido ultrapassado esse valor para o CPZ e NOV. Foram realizadas passagens com as concentrações de CPZ de 2 a 124 mg/L, NOV de 0,01 a 0,4 mg/L, e PZ de 10 mg/L a 110 mg/L.

– Crescimento a temperaturas elevadas

Para a cura do plasmídeo por incubação a temperaturas mais elevadas (82), a estirpe SM52 foi inoculada em 25 mL de meio TSB fresco e incubada em processos independentes a 42°C, 43°C e 45°C com agitação durante a noite (Passagem 0), sendo realizadas dez passagens sucessivas em meio fresco. Para avaliar a capacidade de efluxo de cada cultura, foram realizadas diluições seriadas em PBS, sendo as diluições de 10^{-11} a 10^{-13} plaqueadas em TSA. As diluições foram realizadas em triplicado. As placas foram incubadas à respectiva temperatura durante a noite.

As colónias isoladas obtidas foram analisadas por “replica plating” ou repicadas com auxílio de palitos em novas placas de TSA, TSA com EtBr a 2,5 mg/L e EtBr a 16 mg/L. As placas foram depois incubadas a 37°C durante a noite e a fluorescência das colónias observada sob luz UV. As colónias que apresentaram um aumento de fluorescência nas placas com 2,5 mg/L de EtBr e menor crescimento nas placas com EtBr a 16 mg/L foram depois inoculadas individualmente em 5 mL de meio TSB fresco, e incubadas a 37°C durante a noite, sendo analisadas posteriormente conforme descrito no ponto 2.2.2.

– **Crescimento na presença de SDS**

Outro método testado para a cura do plasmídeo pSM52 foi realizado através do crescimento da estirpe na presença de SDS (“sodium dodecyl sulfate”) (108). A estirpe SM52 foi inoculada em 25 mL de meio TSB fresco suplementado com SDS (Sigma) a 0,002% (p/v) e incubada a 37°C com agitação durante a noite. Para avaliar a cultura foram realizadas diluições seriadas em PBS, sendo as diluições 10^{-9} e 10^{-10} plaqueadas em TSA. As colónias isoladas foram analisadas por “replica plating” ou com o auxílio de palitos como descrito no ponto anterior. Este método foi efectuado em triplicado.

– **Crescimento na presença de SDS a 42°C**

Outro método testado no processo de cura do plasmídeo pSM52 foi o crescimento da estirpe SM52 na presença de SDS à temperatura de 42°C. A estirpe SM52 foi inoculada em 50 mL de meio TSB fresco contendo SDS a 0,002% (p/v) e incubada a 42°C com agitação durante a noite. O restante protocolo foi realizado conforme descrito anteriormente.

– **Plaqueamento directo a partir de “stock” a – 80°C**

A partir de um “stock” mantido a -80°C da estirpe SM52, foram realizadas diluições seriadas em PBS, sendo as diluições de 10^{-5} a 10^{-7} plaqueadas directamente em “Mueller-Hinton agar” (MHA) suplementado com EtBr a 0,5 mg/L (7). As placas foram incubadas a 37°C durante a noite e observou-se a fluorescência das colónias à luz UV. As colónias que apresentaram um aumento de fluorescência foram inoculadas individualmente em 5 mL de meio “Mueller-Hinton broth” (MHB) fresco com incubação a 37°C e analisadas no dia seguinte. Este procedimento foi realizado quatro vezes.

2.2.3 Electrotransformação da estirpe RN4220 com o plasmídeo pSM52

Uma vez que não foi possível obter a cura do plasmídeo pSM52, foi realizada a electrotransformação da estirpe RN4220 com este plasmídeo, de forma a analisar o efeito do gene *smr*/bomba de efluxo Smr numa estirpe susceptível bem caracterizada pela comparação entre o seu fenótipo com o das estirpes SM52 e RN4220.

– Preparação de células electrocompetentes

A partir de uma cultura da estirpe RN4220 crescida durante a noite, realizou-se uma diluição de 1:50 em 98 mL de meio TSB, sendo este incubado a 37°C com agitação até atingir uma densidade óptica a 600 nm (DO_{600nm}) de 0,6 (51, 79). As células foram então recolhidas por centrifugação a 10.000 rpm durante 10 minutos, sendo o sedimento posteriormente lavado com igual volume de 0,5 M sucrose (Sigma) filtrada e centrifugado. Procedeu-se a mais duas lavagens com 0,5X e 0,01X do volume de sucrose a 0,5 M, seguidas de centrifugação. O sedimento foi depois ressuspensionado em 1 mL de sucrose a 0,5 M, transferindo-se alíquotas de 0,5 mL de suspensão celular para microtubos, para utilização imediata ou armazenamento a -80°C.

– Processo de electrotransformação

Para a electrotransformação misturaram-se 47,5 µL de células electrocompetentes com 0,5 µg de DNA plasmídico em “cuvettes” de 0,2 cm do BioRad Gene Pulser II Electroporation System, com posterior incubação em gelo durante 15 minutos. A “cuvette” foi depois colocada na câmara da amostra e electroporada com um único pulso a 25µF, 2,5KV e 100Ω (BioRad Gene Pulser and Pulser Controller). Imediatamente após o pulso, adicionou-se 1 mL de SMMP, misturando-se por inversão. A suspensão celular foi incubada a 37°C durante 1 hora, com agitação. No final deste período, prepararam-se diluições seriadas das células competentes e electroporadas em SMMP, sendo estas plaqueadas em meio “penassay agar” (PA) contendo 5 mg/L de EtBr. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 a 48 horas e os possíveis transformantes inoculados em 5 mL de meio “penassay broth” (PB) na ausência e presença de 5 mg/L de EtBr. As culturas resultantes foram posteriormente analisadas

por extração de DNA plasmídico e pesquisa do gene *smr* por PCR. Foram mantidos “stocks” a -80°C de cada cultura preparada.

2.2.4 Tipagem genética das estirpes em estudo

A tipagem genética das várias estirpes em estudo foi feita através do método de electroforese em campo pulsado (PFGE) (17). A partir de culturas crescidas durante 18 horas, as células foram recolhidas por centrifugação, lavadas e ressuspendidas em tampão PIV. A DO_{620nm} da suspensão celular foi ajustada a 0,5 em tampão PIV. Esta suspensão celular foi misturada com agarose tipo VII “low gelling temperature” (Sigma) a 1,5% (p/v) numa proporção de 1:1, sendo preparados discos de 20 µL cada e colocados a -20°C durante 5 minutos. As células foram lisadas por tratamento com o tampão de lise EC e incubação a 37°C durante 5 horas, sendo posteriormente tratados com solução ESP (desproteinização), a 50°C durante 18 horas. Os discos foram lavados cinco vezes durante 30 minutos com tampão TE 1X, e mantidos em 1 mL de tampão TE 1X a 4°C. O DNA cromossómico, retido no interior dos discos, foi então digerido com a enzima de restrição *SmaI* (Biolabs Inc.) (20U/disco) por incubação a 25°C durante a noite.

O perfil de macro-restrição do DNA cromossómico das estirpes em estudo foi obtido por corrida num aparelho CHEF, de “contour-clamped homogeneous electric field” (CHEF-DRII, Bio-Rad) em gel de agarose SeaKem LE (Lonza, Rockland, Reino Unido) a 1% (p/v) durante 23 horas a 200V (6 V/cm), com pulsos iniciais de 5 segundos e crescentes até 35 segundos. No fim da corrida, o gel foi corado com 0,25 mg/L de EtBr e fotografado num aparelho Gel-doc XR (Bio-Rad).

2.2.5 Caracterização fenotípica das estirpes em estudo

2.2.5.1 Determinação de concentrações mínimas inibitórias de compostos antimicrobianos

A determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMIs) de compostos antimicrobianos para as várias estirpes em estudo foi realizada pelo método da

microdiluição em meio líquido, em placas de 96 poços, de acordo com as regras do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) (18). A CMI é definida como a menor concentração de um composto antimicrobiano que inibe o crescimento visível de um microorganismo. Os compostos antimicrobianos (biocidas, corantes e antibióticos) e as gamas de concentrações testadas para cada composto encontram-se descritos nas Tabelas 14 e 15.

As culturas foram crescidas em meio MHB com incubação a 37°C e agitação durante a noite. A densidade das culturas foi depois ajustada com PBS, de modo a obter uma turbidez equivalente a 0,5 da escala de McFarland. A determinação de CMIs foi realizada em meio MHB, em placa de 96 poços, ao qual foi adicionado 10 µL de composto a partir de uma solução “stock”, sendo realizadas diluições seriadas (factor de dois) do composto. Ao meio suplementado com o composto a testar foi então adicionado 10% (v/v) da suspensão celular. As placas foram incubadas a 37°C, e a presença ou ausência de crescimento em cada cultura foi registada após 18 horas de incubação. A determinação de CMIs para cada estirpe e composto foi realizada em triplicado.

Tabela 14. Gama de concentrações de biocidas e corantes testadas na determinação de CMIs para as estirpes em estudo.

Biocidas e corantes	Gama de concentrações (mg/L)		
	SM39 e SM52	ATCC25923, RN4220 e SM39 curada	RN4220:pSM52
CV, CHX	0 a 1	0 a 1	0 a 1
CPC, DC	0 a 8	0 a 2	0 a 8
BAC, CTAB, CET	0 a 32	0 a 8	0 a 32
EtBr, PT, ACR,	0 a 256	0 a 16	0 a 16
BERB	0 a 256	0 a 256	0 a 256
TPP	0 a 512	0 a 16	0 a 16

CV: violeta de cristal; CHX: clorexidina; CPC: cloreto de cetilpiridínio; DC: cloreto de dequalínio; BAC: cloreto de benzalcónio; CTAB: brometo de hexadeciltrimetilamónio; CET: cetrimida; EtBr: brometo de etídeo; PT: pentamidina; ACR: acriflavina; BERB: berberina; TPP: brometo de tetrafenilfosfónio.

Tabela 15. Gama de concentrações de antibióticos testadas na determinação de CMIs para as estirpes em estudo.

Antibióticos	Gama de concentrações (mg/L)		
	SM52	SM39 e SM39 curada	ATCC25923, RN4220 e RN4220:pM52
GEN, TET, VAN	0 a 8	0 a 8	0 a 8
ERY	0 a 8	0 a 256	0 a 8
PEN, AMP, OXA	0 a 64	0 a 256 (0 a 8 para a SM39 curada)	0 a 2
CIP, NOR, SPX, LEV	0 a 256	0 a 8	0 a 8
CHL, KAN	0 a 512	0 a 512	0 a 8
NOV	0 a 256	-	-
TMP	-	0 a 64	-

GEN: gentamicina; TET: tetraciclina; VAN: vancomicina; ERY: eritromicina; PEN: penicilina; AMP: ampicilina; OXA: oxacilina; CIP: ciprofloxacina; NOR: norfloxacina; SPX: sparfloxacina; LEV: levofloxacina; CHL: cloranfenicol; KAN: canamicina; NOV: novobiocina; TMP: trimetoprim.

2.2.5.2 Determinação de concentrações mínimas inibitórias de inibidores de efluxo

A determinação dos valores de CMIs dos compostos inibidores de efluxo (IEs) CPZ, tioridazina (TZ), verapamil (VER) e reserpina (RES) para as estirpes em estudo foi realizada conforme descrito no ponto 2.2.5.1. As gamas de concentrações testadas foram de 0 a 200 mg/L para CPZ e TZ e de 0 a 400 mg/L para o VER e RES. Foi também determinado o valor de CMI de promazina (PZ) para a estirpe SM52, utilizada nos ensaios de cura do plasmídeo, com uma gama de concentração testada de 0 a 256 mg/L.

2.2.5.3 Determinação de concentrações mínimas inibitórias de compostos antimicrobianos na presença de inibidores de efluxo

A determinação de concentrações mínimas inibitórias de compostos antimicrobianos na presença de inibidores de efluxo foi realizada conforme descrito no ponto 2.2.5.1, utilizando a mesma gama de concentrações dos compostos testada anteriormente. Neste protocolo, após a adição ao meio do composto a testar e da

realização das diluições seriadas deste, foi adicionado ao meio os inibidores a testar a partir de soluções “stock” preparadas de modo a obter os IEs a concentrações a metade ou inferiores ao valor da sua CMI, de modo a garantir a viabilidade celular da estirpe em estudo. As concentrações utilizadas foram: TZ a 12,5 mg/L, CPZ a 25 mg/L, VER a 200 mg/L e RES a 20 mg/L. O meio suplementado com o composto a testar e o IE foi então inoculado com 10% (v/v) da suspensão celular. As placas foram incubadas a 37°C e a presença ou ausência de crescimento para cada cultura foi registada após 18 horas de incubação.

Para análise do efeito inibitório destes compostos sobre o valor de CMI original de cada agente antimicrobiano, considerou-se como indicador de actividade de efluxo, o decréscimo para pelo menos um quarto do valor de CMI do composto na presença do inibidor (24). Como já referido, essa acção foi avaliada a uma concentração sub-inibitória de cada composto. A determinação de CMIs dos compostos antimicrobianos na presença de inibidores foi realizada em triplicado.

2.2.5.4 Detecção de β -lactamases pelo Teste da Nitrocefina

A detecção da presença de β -lactamases nas estirpes SM39, SM39 curada e RN4220 foi realizada através do teste da nitrocefina “BBL™ DrySlide™ Nitrocefin” (BD). Este teste é um método qualitativo que utiliza uma cefalosporina cromogénica, a nitrocefina, para detectar a produção de β -lactamase por diferentes bactérias. Com a produção de β -lactamases, ocorre a hidrólise do anel β -lactâmico da nitrocefina, acompanhada de uma mudança colorimétrica, de amarelo-pálido para rosa.

Para a realização do teste, o um cartão DrySlide™ foi hidratado com uma gota de água estéril, utilizando-se a zona hidratada para fazer um esfregaço com duas a três colónias retiradas de uma placa fresca da estirpe em estudo. Aguardou-se entre 5 a 60 minutos para registar a mudança de cor, comparando-se o resultado com o controlo negativo (estirpe RN4220).

O mesmo procedimento foi repetido para as estirpes induzidas com um antibiótico β -lactâmico, a penicilina, em que foram retiradas colónias periféricas à zona do halo de inibição de um disco de penicilina (Oxoid) de uma placa MHA, conforme as regras para teste de susceptibilidade por Kirby-Bauer.

2.2.5.5 Detecção de sistemas de efluxo activos por um método semi-automático de fluorometria em tempo-real

A actividade de efluxo das estirpes em estudo foi avaliada utilizando um método fluorométrico semi-automático (83, 119), que utiliza o termociclador Rotor-Gene 3000TM (Corbett Research, Sidney, Austrália) e “software” de análise em tempo-real, para detectar em tempo-real, a acumulação e efluxo do EtBr, um substrato comum à maioria das bombas de efluxo. Este aparelho permite a leitura da fluorescência do EtBr nos comprimentos de onda de excitação (530 nm) e emissão deste composto (585 nm).

De forma a determinar a actividade de efluxo presente nas estirpes, foram realizados dois tipos de ensaios; ensaios de acumulação e ensaio de efluxo de EtBr, na presença e na ausência de fonte de energia (glucose) e de inibidores de efluxo.

– Ensaios de acumulação de EtBr

As culturas foram crescidas em 10 mL de TSB, a 37°C com agitação, até uma DO_{600nm} de 0,6. As células foram recolhidas por centrifugação a 13.000 rpm durante 3 minutos e lavadas duas vezes em 1 mL de PBS, sendo a DO_{600nm} da suspensão celular depois ajustada a 0,6. De seguida, de modo a determinar a concentração de EtBr a partir da qual se detecta acumulação, foram preparados vários ensaios com um volume final de 0,1 mL, em que 0,05 mL da suspensão celular foi adicionada a microtubos de 0,2 mL, aos quais tinham sido previamente adicionados 0,05 mL de soluções “stock” de EtBr, de modo a obter concentrações finais de EtBr de 0,25; 0,5; 1; 2; 3 e 4 mg/L. Estes ensaios foram realizados na ausência e presença de glucose à concentração final de 0,4% (v/v). Os microtubos foram depois colocados no rotor do aparelho Rotor-Gene 3000TM. Os ensaios de acumulação foram efectuados a uma temperatura de 37°C e a leitura da fluorescência de EtBr adquirida a 530 e 585 nm, após cada ciclo de 60 segundos, durante 60 minutos. Com os ensaios de acumulação de EtBr pretendeu-se determinar qual a concentração de EtBr a partir da qual se começa a detectar acumulação nas células. Os ensaios foram realizados em triplicado.

– Ensaio de acumulação de EtBr na presença de inibidores de efluxo

De modo a verificar a influência de inibidores de efluxo na actividade de efluxo do EtBr, as culturas bacterianas foram tratadas de forma idêntica ao anteriormente descrito até se obter uma suspensão celular com DO_{600nm} de 0,6. De seguida, foram preparados vários ensaios com um volume final de 0,1 mL, em que 0,05 mL da suspensão celular foi adicionada a 0,05 mL de soluções de trabalho preparadas de modo a obter-se as seguintes concentrações finais: i) glucose (0,4% v/v); ii) glucose (0,4% v/v) e EtBr a 0,25 mg/L (RN4220, SM39 curada), 0,5 mg/L (SM52), 1 mg/L (RN4220:pSM52) ou 2 mg/L (SM39); iii) glucose (0,4% v/v) e EtBr a 0,25 mg/L (RN4220, SM39 curada), 0,5 mg/L (SM52), 1 mg/L (RN4220:pSM52) ou 2 mg/L (SM39) e inibidor a testar; iv) EtBr a 0,25 mg/L (RN4220, SM39 curada), 0,5 mg/L (SM52), 1 mg/L (RN4220:pSM52) ou 2 mg/L (SM39); v) EtBr a 0,25 mg/L (RN4220, SM39 curada), 0,5 mg/L (SM52), 1 mg/L (RN4220:pSM52) ou 2 mg/L (SM39) e inibidor a testar; vi) PBS (volume igual a glucose + EtBr). As soluções “stock” dos inibidores de efluxo CPZ, TZ, VER e RES foram preparadas de modo a obter uma concentração final de CPZ de 25 mg/L, TZ a 12,5 mg/L, VER a 200 mg/L e RES a 20 mg/L.

Os ensaios de acumulação foram efectuados a uma temperatura de 37°C e a leitura da fluorescência de EtBr adquirida a 530 e 585 nm, após cada ciclo de 60 segundos, durante 60 minutos. Com estes ensaios pretendeu-se determinar qual o inibidor que proporciona maior acumulação de EtBr nas células. Os ensaios foram realizados em triplicado.

– Ensaio de efluxo de EtBr

Para se efectuar um ensaio de efluxo de EtBr, é necessário garantir que as células acumularam previamente o EtBr. As culturas das estirpes foram tratadas de modo idêntico ao anteriormente descrito até se obter uma suspensão celular de DO_{600nm} de 0,6. Num tubo de 15 mL, as células desta suspensão celular com DO_{600nm} de 0,3 foram carregadas com EtBr durante 60 minutos em condições que permitissem a máxima acumulação de EtBr e minimizassem a actividade de efluxo, ou seja, ausência de glucose, baixa temperatura (25°C), concentração de EtBr desejada (0,25 mg/L para as

estirpes RN4220 e SM39 curada; 0,5 mg/L para a estirpe SM52; 1 mg/L para a estirpe RN4220:pSM52; e 2 mg/L para a estirpe SM39), e presença do inibidor de efluxo que promove uma maior acumulação de EtBr (verapamil a 200 mg/L). Após o período de incubação, as células foram recolhidas por centrifugação a 13.000 rpm durante 5 minutos. Cada sedimento foi ressuspendido em PBS de modo a obter uma suspensão celular com DO_{600nm} de 0,6 e transferido para um novo tubo. Vários ensaios foram depois preparados num volume final de 0,1 mL em que 0,05 mL da suspensão celular foi adicionada aos microtubos de 0,2 mL, nos quais tinha sido previamente colocado: i) 0,05 mL de PBS; ii) 0,05 mL de glucose (0,4% v/v); iii) 0,05 mL de solução “stock” de verapamil, de modo a obter a concentração final de 200 mg/L; e iv) 0,05 mL de verapamil (concentração final de 200 mg/L) e glucose (0,4% v/v). No final, a suspensão celular apresenta uma DO_{600nm} de 0,3.

Os tubos foram depois colocados no aparelho Rotor-Gene 3000TM. O ensaio de efluxo foi efectuado a uma temperatura de 37°C e a leitura da fluorescência de EtBr foi adquirida após cada ciclo de 10 segundos, durante 10 minutos. Os dados obtidos foram normalizados por comparação da fluorescência obtida em cada ponto com a fluorescência obtida nas condições de máxima acumulação (na presença do verapamil e ausência de glucose), realizadas durante o mesmo ensaio. A fluorescência relativa foi então determinada, considerando que o valor máximo de fluorescência corresponde a 1. As concentrações de EtBr e do inibidor utilizadas foram sempre de valor igual a metade ou inferior à CMI para cada estirpe. Os ensaios foram realizados em triplicado.

2.2.6 Caracterização genotípica das estirpes SM39, SM39 curada, SM52 e RN4220:pSM52

2.2.6.1 Extracção de DNA plasmídico

A extracção de DNA plasmídico das colónias obtidas nos vários processos de cura dos plasmídeos pSM39 e pSM52 e na electrotransformação da RN4220 com o pSM52 foi realizada por dois protocolos de extracção distintos. No rastreio das colónias obtidas nos processos de cura e de electrotransformação foi utilizada a extracção de DNA plasmídico pelo protocolo descrito por Novick (82). Após cultura durante a noite, as

células bacterianas foram recolhidas por centrifugação e lavadas com tampão SET, sendo posteriormente lisadas com 150 µL de solução de lise I e incubadas a 37°C por 30 minutos. Após o período de incubação, foi adicionada 350 µL de solução de lise II, homegeneizando por inversão suave e com incubação em gelo durante 10 minutos. De seguida, foi adicionado acetato de amónio (Fluka) arrefecido, a 5 M com incubação em gelo, e posterior centrifugação, sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo. Foi adicionado isopropanol (Sigma) e procedeu-se a uma nova centrifugação seguida de lavagem com 1 mL de etanol (EtOH) a 70%. Após a secagem do sedimento, este foi ressuspenso em 30 µL de tampão TE 1X e as amostras guardadas a -20°C.

A confirmação da perda do plasmídeo nas colónias positivas dos processos de cura e a confirmação da electrotransformação com o plasmídeo pSM52 foi realizada pela extracção de DNA plasmídico com a utilização do “QIAprep Spin Miniprep kit” (QIAGEN, Hilden, Alemanha). O sistema “Plasmid Midi kit” (QIAGEN, Hilden, Alemanha) foi utilizado para extracção de DNA plasmídico da estirpe SM52, de modo a obter um maior rendimento do plasmídeo pSM52 a utilizar no protocolo de electrotransformação. A extracção de DNA plasmídico pelo “QIAprep Spin Miniprep kit” e “Plasmid Midi kit” foi realizada a partir de culturas crescidas em TSB durante a noite. O passo de lise celular foi alterado pela adição de lisostafina ao tampão de ressusensão celular para uma concentração final de 35 mg/L, e posterior incubação a 37°C durante 90 minutos (6). Estes protocolos baseiam-se na lise alcalina celular seguida de adsorção do DNA a colunas com membrana de sílica, na presença de elevada concentração salina, e posterior eluição do DNA com um tampão específico (95, 96).

A presença do plasmídeo foi observada por electroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 0,7% (p/v) com 0,25 mg/L EtBr, em tampão TAE 1X e com voltagem de 80 V durante 45 minutos, num sistema da Pharmacia Biotech GNA 100 (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) e fonte de alimentação Amersham Pharmacia Biotech EPS 301. Os resultados foram registados num aparelho Gel-doc XR.

2.2.6.2 Detecção por PCR da presença dos genes em estudo

A presença dos genes *smr* e *qacA/B* foi analisada pela amplificação de fragmentos internos aos genes por reacção de PCR, utilizando os “primers” previamente descritos (Tabela 13).

A reacção de PCR foi preparada adicionando a 5 µL de DNA plasmídico uma mistura de reacção de 45 µL contendo 1X tampão *Taq* (Fermentas); 2 U de *Taq* Polimerase (Fermentas); 20 pmol de cada “primer”; 200 µM de cada dNTP (GE Healthcare) e 1,75 mM de MgCl₂ (Fermentas). Para todas as reacções preparou-se um controlo negativo, em que o volume de DNA foi substituído por água bidestilada estéril.

As reacções de PCR foram conduzidas num termociclador “Mastercycler personal 5332” (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha). Para a amplificação dos genes em estudo foi utilizado o seguinte programa de amplificação: desnaturação do DNA a 95°C durante 1 minuto, sendo amplificado durante 30 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 1 minuto, emparelhamento a 40°C para o gene *qacA/B* e 48°C para o gene *smr* durante 45 segundos, extensão a 72°C durante 1 minuto, e extensão final a 72°C durante 5 minutos.

Os produtos de amplificação foram analisados por electroforese em gel de agarose a 2% (p/v) com 0,25 mg/L EtBr, em tampão TAE 1X e com voltagem de 80 V durante 45 minutos como descrito anteriormente no ponto 2.2.6.1.

3 Resultados

3.1 Estudo da bomba de efluxo QacA

Num estudo anterior, foi realizada uma caracterização inicial de 53 isolados clínicos de *S. aureus*, seleccionados com base no seu fenótipo de resistência à ciprofloxacina. De entre os 53 isolados clínicos, o gene *qacA/B* foi detectado por PCR em apenas um isolado, a estirpe MRSA SM39 (27). Esta estirpe apresentava uma CMI para o EtBr muito elevada, de 256 mg/L (27). Contudo, no seguimento desse estudo, foi observada a perda da susceptibilidade reduzida ao EtBr acompanhada da não detecção do gene *qacA/B* por PCR. A partir de um novo isolamento da estirpe SM39, foi possível distinguir dois tipos de colónias distintas, colónias laranjas (SM39-L) e colónias amarelas (SM39-A). Foram obtidas culturas puras de SM39-L e SM39-A e estas submetidas a nova determinação de CMIs para o EtBr e fluoroquinolonas. Observou-se então que a SM39-L era susceptível às fluoroquinolonas e apresentava uma CMI elevada para o EtBr (256 mg/L), em oposição à SM39-A. Das duas estirpes, apenas SM39-L possuía um plasmídeo, o qual apresentava amplificação com os primers para o gene *qacA/B* (S. S. Costa, comunicação pessoal). Assim, a estirpe SM39-L foi a seleccionada para ser caracterizada mais detalhadamente, passando a ser designada por estirpe SM39 ao longo desta Dissertação. Como já referido, esta estirpe possui um plasmídeo, de cerca de 35 Kb, denominado pSM39. A análise posterior por restrição e sequenciação revelou que o gene *qac* do plasmídeo pSM39 corresponde ao gene *qacA* e não ao gene *qacB* (S. S. Costa, comunicação pessoal).

O efeito da presença ou ausência do gene *qacA* no perfil de susceptibilidade reduzida a diferentes compostos antimicrobianos na estirpe SM39 foi analisado pela caracterização das estirpes SM39 e SM39 curada através da determinação de CMIs e da actividade de efluxo apresentada pelas duas estirpes.

3.1.1 Cura do plasmídeo pSM39

O processo de cura do plasmídeo pSM39 teve como objectivo obter a estirpe SM39 curada de modo a analisar qual o efeito da presença/ausência do plasmídeo/gene *qacA*

no perfil de resistência apresentado pela estirpe SM39 a diferentes compostos antimicrobianos.

A cura do plasmídeo pSM39 foi realizada através do crescimento da estirpe SM39 na presença de concentrações subinibitórias crescentes de clorpromazina (CPZ). Para monitorizar o processo de cura, algumas culturas foram plaqueadas em placas de TSA suplementadas com EtBr a 2,5 mg/L.

As passagens na presença de CPZ terminaram na passagem #7 (14 mg/L de CPZ), sendo a CMI de CPZ para a estirpe SM39 de 50 mg/L. Nesta passagem, seleccionaram-se oito colónias fluorescentes, que foram submetidas a extracção de DNA plasmídico e análise da presença do gene *qacA* por PCR. Das oito colónias fluorescentes analisadas, seis não apresentaram a banda de 628 pb correspondente ao fragmento do gene *qacA*. Destas seis colónias fluorescentes que não apresentaram o gene *qacA*, foram seleccionadas duas colónias (designadas por F1 e F4), que foram submetidas a nova extracção de DNA plasmídico pelo “QIAprep Spin Miniprep kit” e PCR para confirmação da ausência de *qacA* (Figura 7).

A cultura preparada a partir da inoculação da colónia F1 foi seleccionada para ser caracterizada nos passos seguintes, de determinação de CMIs e ensaios fluorométricos, passando a ser designada por SM39 curada.

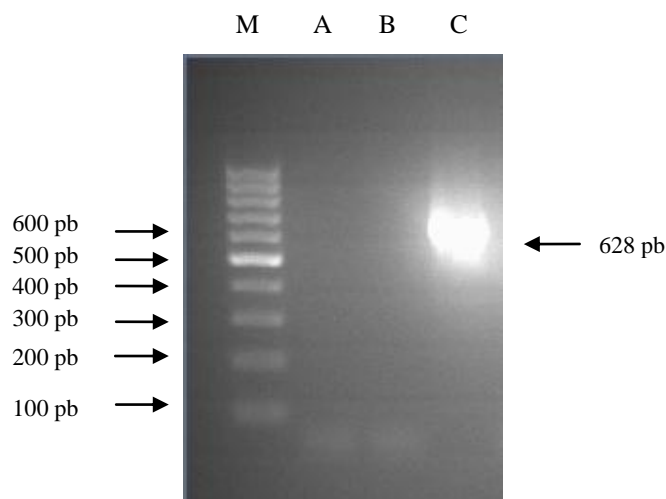


Figura 7. Electroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de amplificação de um fragmento interno ao gene *qacA* após extracção de DNA plasmídico de duas colónias fluorescentes da passagem #7 com CPZ da estirpe SM39. M: Marcador 100 bp DNA Ladder Plus Gene Ruler; A: Colónia fluorescente F1; B: Colónia fluorescente F4; C: Estirpe SM39.

A tipagem por PFGE das estirpes SM39 e SM39 curada permitiu garantir a pureza das estirpes ao longo do trabalho, já que a estirpe SM39 curada apresenta um perfil de macro-restrição idêntico à estirpe SM39 (Figura 8), eliminando a possibilidade de ter ocorrido contaminação durante o processo de cura do plasmídeo pSM39.

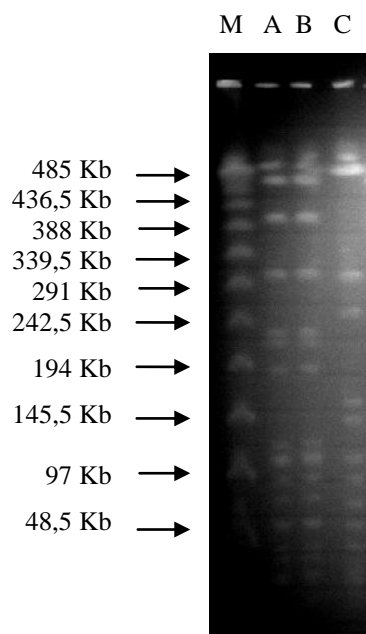


Figura 8. Electroforese em gel de agarose SeaKem LE a 1% dos produtos de macro-restrição com *SmaI* por PFGE. M: Marcador lambda Ladder PFGE; A: SM39; B: SM39 curada; C: RN4220.

3.1.2 Caracterização de estirpes SM39, SM39 curada e RN4220

3.1.2.1 Determinação de concentrações mínimas inibitórias de compostos antimicrobianos e de inibidores de efluxo

– Concentração mínima inibitória de compostos antimicrobianos

O perfil de susceptibilidade a vários compostos antimicrobianos das estirpes SM39 e SM39 curada foi obtido pela determinação da concentração mínima inibitória de diferentes biocidas, corantes e antibióticos. Foram também determinados os valores de CMIs para a estirpe RN4220 utilizada neste estudo como estirpe de referência.

Os valores de CMIs de cada composto para as estirpes SM39, SM39 curada e RN4220 são apresentados na Tabela 16 e correspondem ao resultado de três ensaios independentes concordantes.

Tabela 16. Valores de CMIs de diferentes compostos antimicrobianos para as estirpes RN4220, SM39 e SM39 curada.

Composto	CMIs (mg/L)		
	RN4220	SM39	SM39 curada
Biocidas e Corantes			
EtBr	2	256	4
CV	0,125	1	0,125
ACR	8	256	16
TPP	8	512	16
CTAB	2	8	1
CET	2	16	4
BAC	1	8	1
CPC	0,5	4	0,5
BERB	64	>256	64
DC	1	8	1
CHX	0,5	1	0,5
PT	8	256	16
Antibióticos ^(a)			
CIP	0,25 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)
NOR	1 (S)	1 (S)	1 (S)
LEV	0,25 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)
SPX	0,125 (S)	0,125 (S)	0,125 (S)
OXA	0,125 (S)	32 (R)	8 (R)
AMP	0,125 (S)	128 (R)	8 (R)
PEN	0,008 (S)	64 (R)	2 (R)
VAN	1 (S)	1 (S)	1 (S)
GEN	0,25 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)
KAN	4 (S)	256 (R)	256 (R)
ERY	0,25 (S)	>256 (R)	>256 (R)
TET	0,25 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)
CHL	4 (S)	8 (S)	8 (S)
TMP	1 (S)	2 (S)	2 (S)

EtBr: brometo de etídeo; CV: violeta de cristal; ACR: acriflavina; TPP: brometo de tetrafenilfosfônio; CTAB: brometo de hexadeciltrimetilamônio; CET: cetrimida; BAC: cloreto de benzalcônio; CPC: cloreto de cetilpiridínio; BERB: berberina; DC: cloreto de dequalínio; CHX: clorexidina; PT: pentamidina; CIP: ciprofloxacina; NOR: norfloxacina; LEV: levofloxacina; SPX: sparfloxacina; OXA: oxacilina; AMP: ampicilina; PEN: penicilina; VAN: vancomicina; GEN: gentamicina; KAN: canamicina; ERY: eritromicina; TET: tetraciclina; CHL: cloranfenicol; TMP: trimetoprim. ^(a) S: sensível; R: resistente, de acordo com os “breakpoints” definidos pelas normas CLSI (18).

Na Tabela 16, pode-se observar que a estirpe RN4220 é sensível a todos os antibióticos testados, apresentando também valores de CMI's baixos para os biocidas e corantes utilizados.

A estirpe SM39, que possui o plasmídeo pSM39 com o determinante *qacA* que codifica para a bomba de efluxo QacA, apresenta um perfil de susceptibilidade reduzida a todos os biocidas e corantes testados, sendo os valores de CMI's muito superiores aos obtidos para a estirpe RN4220 (Tabela 16). No respeitante ao perfil de susceptibilidade aos antibióticos, a estirpe SM39 apresenta um fenótipo de resistência aos β -lactâmicos oxacilina, ampicilina e penicilina, ao aminoglicosídeo canamicina e ao macrólido eritromicina e um fenótipo de susceptibilidade aos restantes antibióticos testados.

A estirpe SM39 curada (sem o plasmídeo pSM39 e respectivo gene *qacA*) apresenta um perfil de susceptibilidade a todos os biocidas e corantes testados semelhante ao da estirpe RN4220. Os valores de CMI's destes compostos para a SM39 curada são muito inferiores quando comparados com a estirpe SM39.

Em relação à susceptibilidade aos antibióticos, a estirpe SM39 curada apresenta o mesmo perfil que a estirpe SM39, sendo resistente aos β -lactâmicos oxacilina, ampicilina e penicilina, à canamicina e à eritromicina. No entanto, observa-se uma redução dos valores de CMI's para os β -lactâmicos na SM39 curada.

– **Concentração mínima inibitória de inibidores de efluxo**

Os valores de CMI's dos inibidores de efluxo obtidos foram iguais para todas as estirpes em estudo e encontram-se descritos na Tabela 17. Estes valores foram utilizados para determinar as concentrações destes compostos a aplicar nos ensaios de determinação de CMI's e de fluorometria na presença de inibidores, tendo-se trabalhado com concentrações que correspondem a metade do valor da sua CMI ou inferiores a este, de modo a garantir que a sua presença não interfere com a viabilidade celular (Tabela 17). As concentrações de tioridazina e clorpromazina utilizadas corresponderam a metade da CMI, enquanto as concentrações de verapamil e reserpina utilizadas foram as descritas na literatura, uma vez que não é possível determinar a CMI do verapamil e que a reserpina apresenta uma solubilidade muito baixa precipitando a concentrações elevadas (1, 20, 77).

Tabela 17. Valores de CMI de inibidores de efluxo para as estirpes em estudo.

Inibidor de efluxo	CMI (mg/L) ^(a)	Concentração utilizada (mg/L) ^(b)
TZ	25	12,5
CPZ	50	25
VER	>400	200
RES	>40	20

TZ: tioridazina; CPZ: clorpromazina; VER: verapamil; RES: reserpina.

^(a) Os valores são iguais para as estirpes SM39, SM39 curada e RN4220.

^(b) Concentração de inibidor utilizada na determinação de CMIs dos compostos antimicrobianos na presença de inibidores e nos ensaios de fluorometria.

– Concentração mínima inibitória de compostos antimicrobianos na presença de inibidores de efluxo

Para determinar o efeito de inibidores de efluxo na actividade da bomba de efluxo QacA, foram determinados os valores de CMI para o mesmo conjunto de compostos antimicrobianos na presença dos inibidores de efluxo tioridazina, clorpromazina, verapamil e reserpina, com excepção dos antibióticos vancomicina, gentamicina, canamicina, eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol e trimetoprim, uma vez que se verificou que a susceptibilidade ou resistência a estes antibióticos não é influenciada pela presença/ausência do plasmídeo pSM39.

Os valores de CMIs de cada composto para as estirpes em estudo na presença dos inibidores de efluxo encontram-se na Tabela 18. Os resultados obtidos são o resultado de três ensaios independentes com resultados concordantes.

Tabela 18. Valores de CMIs de compostos antimicrobianos na ausência e presença de inibidores de efluxo para as estirpes RN4220, SM39 e SM39 curada.

Composto	CMIs (mg/L)														
	RN4220					SM39					SM39 curada				
	Sem IE	TZ	CPZ	VER	RES	Sem IE	TZ	CPZ	VER	RES	Sem IE	TZ	CPZ	VER	RES
Biocidas e Corantes															
EtBr	2	0,125	0,125	0,25	0,25	256	0,5	1	64	128	4	0,25	0,5	1	1
CV	0,125	0,004	0,004	0,03	0,004	1	0,002	0,002	0,25	1	0,125	0,01	0,03	0,06	0,06
ACR	8	1	1	2	2	256	4	16	128	128	16	4	4	2	8
TPP	8	0,25	0,25	2	0,5	512	2	2	128	512	16	1	2	4	8
CTAB	2	0,03	0,03	0,25	0,125	8	≤0,06	0,125	4	4	1	0,125	0,125	0,25	1
CET	2	0,06	0,06	0,06	0,06	16	≤0,06	0,125	8	8	4	0,25	0,25	1	2
BAC	1	≤0,01	≤0,01	0,03	≤0,01	8	0,03	0,25	2	4	1	0,06	0,06	0,125	0,25
CPC	0,5	≤0,004	0,008	0,03	0,06	4	0,01	0,06	4	4	0,5	0,03	0,06	0,25	0,5
BERB	64	16	16	16	32	>256	16	32	>256	>256	64	32	32	32	64
DC	1	0,01	0,5	0,25	0,125	8	0,5	≤0,25	2	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5
CHX	0,5	0,008	0,03	0,03	0,03	1	0,06	0,125	0,5	1	0,5	0,03	0,06	0,06	0,25
PT	8	2	2	4	8	256	4	16	128	256	16	8	8	8	16
Antibióticos															
CIP	0,25	0,125	0,125	0,125	0,25	0,5	0,06	0,06	0,125	0,25	0,5	0,125	0,125	0,125	0,125
NOR	1	0,25	0,25	0,25	0,25	1	0,125	0,125	0,25	1	1	0,5	0,25	0,25	0,25
LEV	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,125	0,125	0,125	0,125	0,25	0,125	0,125	0,125	0,125
SPX	0,125	0,06	0,06	0,06	0,06	0,125	0,06	0,06	0,125	0,06	0,125	0,125	0,06	0,125	0,06
OXA	0,125	0,01	0,03	0,06	0,06	32	8	≤1	8	16	8	0,06	8	2	1
AMP	0,125	0,03	0,03	0,06	0,06	128	4	16	128	128	8	0,125	0,125	1	4
PEN	0,008	≤0,002	0,004	0,004	0,008	64	8	32	64	128	2	≤0,01	0,5	0,06	2

EtBr: brometo de etídeo; CV: violeta de cristal; ACR: acriflavina; TPP: brometo de tetrafenilfosfônio; CTAB: brometo de hexadeciltrimetilamônio; CET: cetrimida; BAC: cloreto de benzalcônio; CPC: cloreto de cetilpiridínio; BERB: berberina; DC: cloreto de dequalínio; CHX: clorexidina; PT: pentamidina; CIP: ciprofloxacina; NOR: norfloxacina; LEV: levofloxacina; SPX: sparfloxacina; OXA: oxacilina; AMP: ampicilina; PEN: penicilina; VAN: vancomicina; GEN: gentamicina; KAN: canamicina; ERY: eritromicina; TET: tetraciclina; CHL: cloranfenicol; TZ: tioridazina; CPZ: clorpromazina; VER: verapamil; RES: reserpina. Os valores a negrito correspondem àqueles em que ocorreu uma diminuição de CMI para pelo menos um quarto do seu valor original (24). Os IEs foram utilizados a metade (ou abaixo) do seu valor de CMI para cada estirpe, sendo as concentrações utilizadas: 12,5 mg/L de TZ; 25 mg/L de CPZ; 200 mg/L de VER e 20 mg/L de RES.

Na Tabela 18 pode-se observar que dos inibidores de efluxo testados, a tioridazina e a clorpromazina foram os que apresentaram maior efeito inibitório, promovendo uma redução nos valores de CMI de todos os biocidas e corantes testados tanto para a estirpe SM39 como para a estirpe SM39 curada e a estirpe de referência RN4220. Os inibidores de efluxo verapamil e reserpina apresentaram um efeito inibitório menor ou por vezes ausente na redução dos valores de CMIs, nomeadamente nas estirpes SM39 e SM39 curada. Na estirpe SM39, verifica-se uma redução dos valores de CMIs na presença de tioridazina e clorpromazina de 16 a 512 vezes em todos os biocidas e corantes testados, observando-se as maiores reduções nos compostos brometo de etídeo, violeta de cristal, brometo de tetrafenilfosfónio, ceftriaxona, cloreto de benzalcónio, cloreto de cetilpiridínio e clorexidina, e para valores inferiores aos apresentados pela estirpe RN4220 (na ausência de inibidores). Por outro lado, nas estirpes RN4220 e SM39 curada, o efeito destes inibidores foi inferior, uma vez que a diminuição dos valores de CMIs para os biocidas e corantes testados variou apenas entre 4 a 125 vezes na estirpe RN4220 e de 4 a 16 vezes na SM39 curada.

Os valores de CMIs das fluoroquinolonas ciprofloxacina e norfloxacina e dos β -lactâmicos oxacilina, ampicilina e penicilina para as estirpes em estudo também apresentam uma redução significativa na presença da tioridazina e da clorpromazina.

3.1.2.2 Produção de β -lactamases

O teste da nitrocefina foi realizado para a detecção de β -lactamases na estirpe SM39, uma vez que os resultados de CMIs para os antibióticos β -lactâmicos sugeriram a presença de determinantes de resistência a esta classe de antibióticos no plasmídeo pSM39. A presença de β -lactamase foi verificada na estirpe SM39 pelo aparecimento de coloração rosa no cartão DrySlideTM (Figura 9-a). Por outro lado, não foi detectada a presença de β -lactamase na estirpe SM39 curada nem na estirpe RN4220 (utilizada como controlo negativo). Os resultados obtidos permitiram demonstrar a presença de β -lactamase no plasmídeo pSM39.

Para a confirmação dos resultados anteriores, o teste da nitrocefina foi repetido, após exposição destas mesmas culturas à penicilina, uma vez que algumas estirpes só produzem β -lactamases quando induzidas com antibióticos β -lactâmicos. Os resultados

obtidos foram iguais aos verificados anteriormente (Figura 9-b), confirmando-se a presença de actividade de β -lactamase na estirpe SM39 e a sua ausência na estirpe SM39 curada.

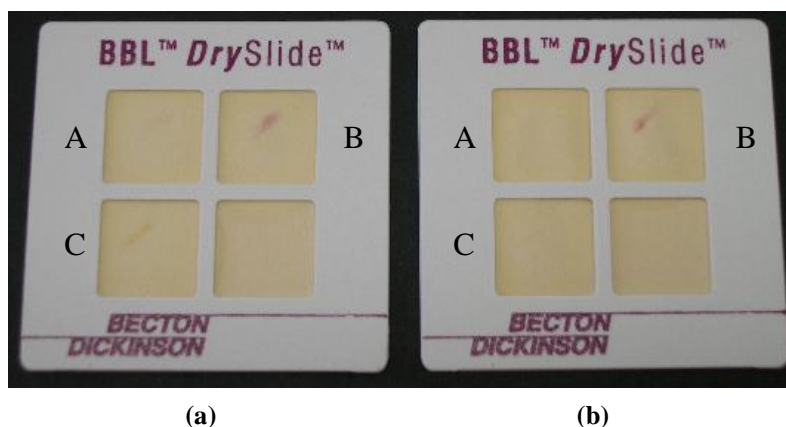


Figura 9. Teste de produção de β -lactamases pelo sistema “BBL™ DrySlide™ Nitrocefin”. (a) Teste da nitrocefina sem indução; A: RN4220, B: SM39; C: SM39 curada. (b) Teste da nitrocefina com indução com penicilina; A: RN4220, B: SM39; C: SM39 curada.

3.1.2.3 Detecção de efluxo por fluorometria em tempo-real

Neste trabalho, utilizou-se um método fluorométrico semi-automático para a monitorização do transporte do substrato de bombas de efluxo, o EtBr, como forma de avaliar a actividade de efluxo das estirpes RN4220, SM39 e SM39 curada e compará-las em termos de presença e ausência do determinante da bomba de efluxo QacA.

Esta técnica permite detectar de forma rápida e em tempo-real o transporte de EtBr através da parede celular bacteriana, em concentrações que não interferem com a viabilidade celular, utilizando uma metodologia que permite a distinção entre acumulação e efluxo deste composto.

– Ensaios de acumulação de EtBr

Os ensaios de acumulação de EtBr foram realizados de forma a determinar qual a concentração de EtBr a partir da qual se começa a detectar acumulação nas células. Uma vez no interior das células, o EtBr proporciona um aumento da fluorescência

emitida. No entanto, na presença de sistemas de efluxo activos, verifica-se a extrusão de EtBr para fora das células, não permitindo a sua acumulação e concomitante aumento dos níveis de fluorescência. Assim, nas condições apropriadas, quanto menor a fluorescência, maior a actividade de efluxo.

As estirpes SM39, SM39 curada e RN4220 foram expostas a concentrações crescentes de EtBr, de 0,25 mg/L a 4 mg/L, de modo a seleccionar a concentração de EtBr a partir da qual se detecta acumulação de EtBr dentro das células. Esta concentração de EtBr será depois a utilizada nos ensaios posteriores.

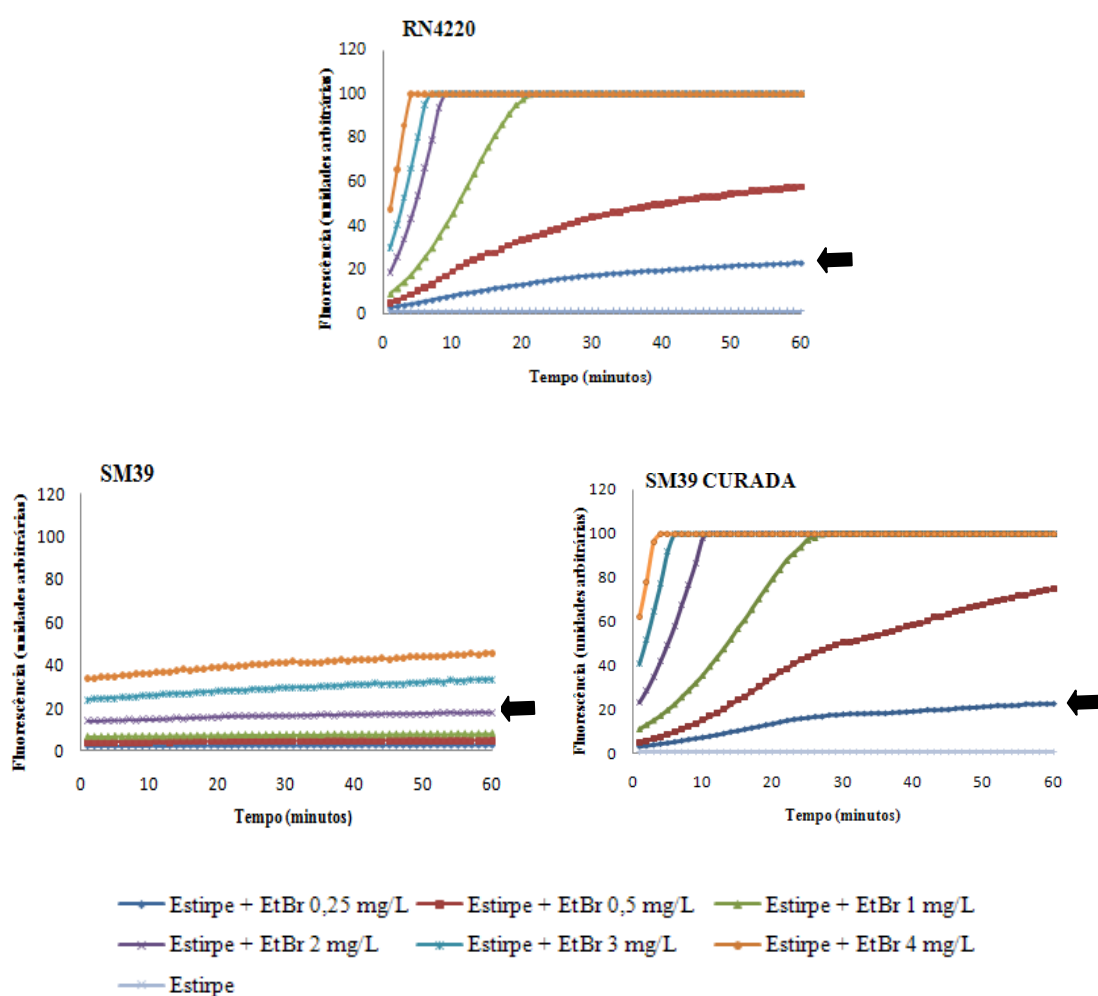


Figura 10. Ensaio de acumulação de EtBr para as estirpes RN4220, SM39 e SM39 curada, na presença de concentrações crescentes de EtBr. As setas indicam a concentração de EtBr a partir da qual se detecta acumulação para cada estirpe.

A estirpe RN4220 é uma estirpe de referência, com uma actividade de efluxo basal, não tendo capacidade para extrusar o EtBr e apresentando maior acumulação deste nas células. Na Figura 10 pode-se observar que a estirpe RN4220 apresenta acumulação máxima de EtBr ao fim dos primeiros minutos de ensaio nas concentrações de EtBr a 2, 3 e 4 mg/L, sendo necessária uma concentração menor de EtBr para se detectar acumulação.

Por outro lado, a estirpe SM39 apresenta uma menor acumulação de EtBr nas células, sendo necessária uma maior concentração deste composto para se detectar acumulação. Assim, mesmo na presença de 4 mg/L de EtBr, esta estirpe apresenta níveis de fluorescência bastante inferiores aos detectados para as estirpes RN4220 e a SM39 curada (Figura 10).

Por último, a estirpe SM39 curada acumula EtBr até ao valor máximo detectável logo nos primeiros minutos do ensaio para as concentrações de EtBr de 2, 3 e 4 mg/L, nível que se mantém até ao final do ensaio. Esta estirpe apresenta assim níveis de acumulação de EtBr semelhantes ao da estirpe RN4220 e muito mais elevados do que a estirpe SM39.

De acordo com os resultados obtidos (Figura 10), as concentrações de EtBr escolhidas para os ensaios seguintes foram de 0,25 mg/L para as estirpes SM39 curada e RN4220 e de 2 mg/L para a estirpe SM39.

– **Ensaio de acumulação com inibidores de efluxo**

Os ensaios de acumulação na presença de inibidores de efluxo foram realizados de forma a seleccionar o inibidor mais eficaz, ou seja, aquele que ao inibir o efluxo de EtBr, permite maior acumulação deste no interior das células. A concentração de EtBr escolhida para cada estirpe foi a determinada anteriormente nos ensaios de acumulação. A concentração de cada inibidor de efluxo utilizada no ensaio foi metade do valor da sua CMI, ou inferior a esta (Figura 11).

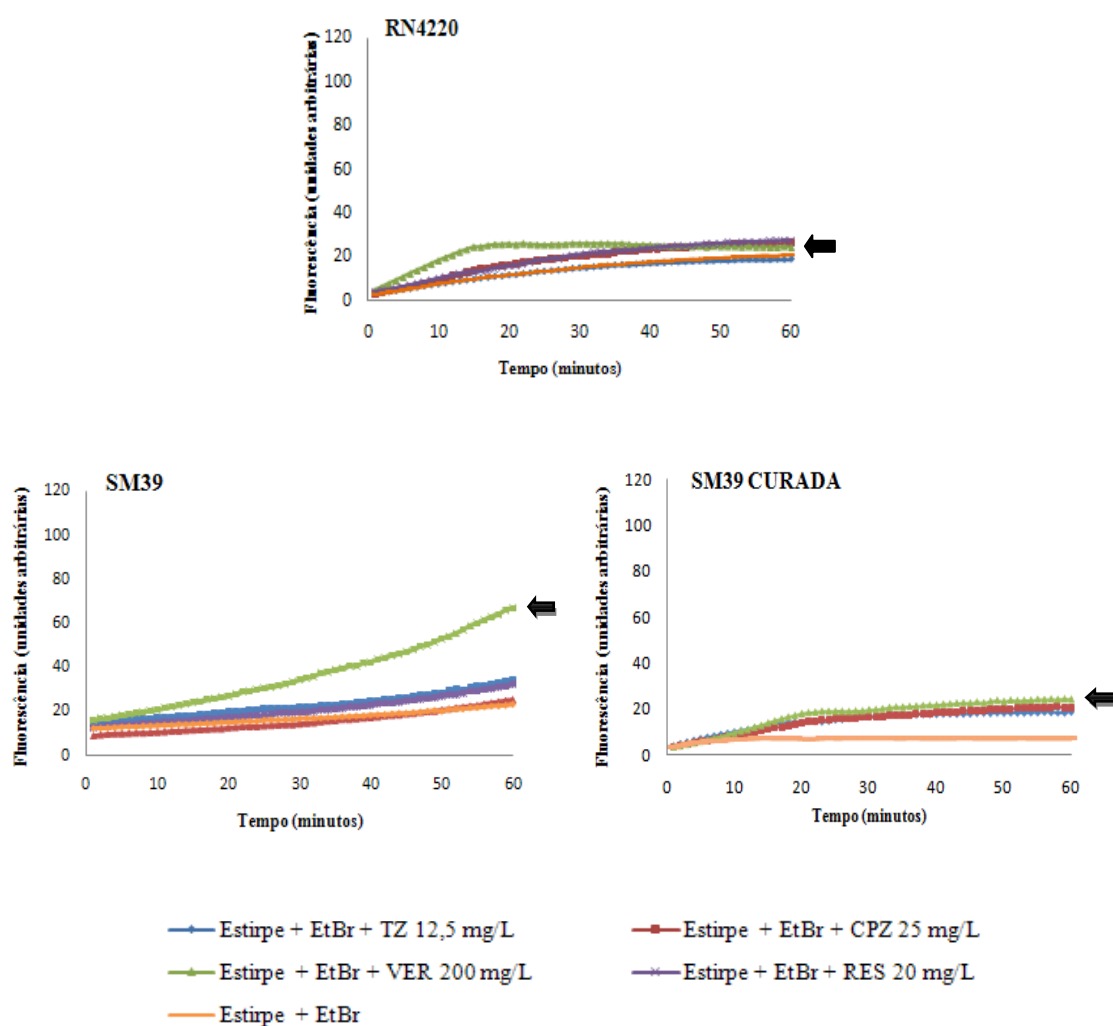


Figura 11. Ensaio de acumulação de EtBr para as estirpes RN4220, SM39 e SM39 curada, na presença de concentrações subinibitórias de inibidores de efluxo. As concentrações de EtBr utilizadas para cada estirpe foram de 0,25 mg/L (RN4220 e SM39 curada) e de 2 mg/L (SM39). As setas indicam o inibidor mais eficaz para cada estirpe.

Pela Figura 11, observa-se que para todas as estirpes em estudo houve maior acumulação de EtBr na presença de verapamil, sendo este o inibidor de efluxo que demonstrou maior eficácia, quando comparado com os outros inibidores testados.

A estirpe RN4220 não apresenta um aumento significativo de acumulação de EtBr na presença dos inibidores de efluxo, verificando-se que os níveis de acumulação de EtBr mantiveram-se baixos (não ultrapassando as 20 unidades arbitrárias de fluorescência). No entanto, verifica-se um ligeiro aumento da acumulação de EtBr na presença de verapamil.

O efeito dos inibidores de efluxo foi maior para a estirpe SM39, verificando-se um ligeiro aumento da acumulação de EtBr na presença destes compostos, aumento esse que foi mais significativo na presença do verapamil.

A estirpe SM39 curada, à semelhança da RN4220, não apresenta um aumento significativo de acumulação de EtBr na presença de inibidores de efluxo, verificando-se apenas um ligeiro aumento da fluorescência.

– **Ensaaios de efluxo**

Os ensaios de efluxo foram realizados de acordo com as condições (concentração de EtBr e inibidor de efluxo) estabelecidos anteriormente para cada estirpe. As condições necessárias para a realização destes ensaios incluem a presença de glucose, que proporciona a condição máxima de efluxo, e a presença de inibidor de efluxo, que proporciona a condição mínima de efluxo. O inibidor utilizado nestes ensaios foi o verapamil por ter sido aquele que demonstrou ter maior efeito nos ensaios de acumulação com inibidores de efluxo. Os ensaios de efluxo para as estirpes SM39, SM39 curada e RN4220 encontram-se apresentados na Figura 12.

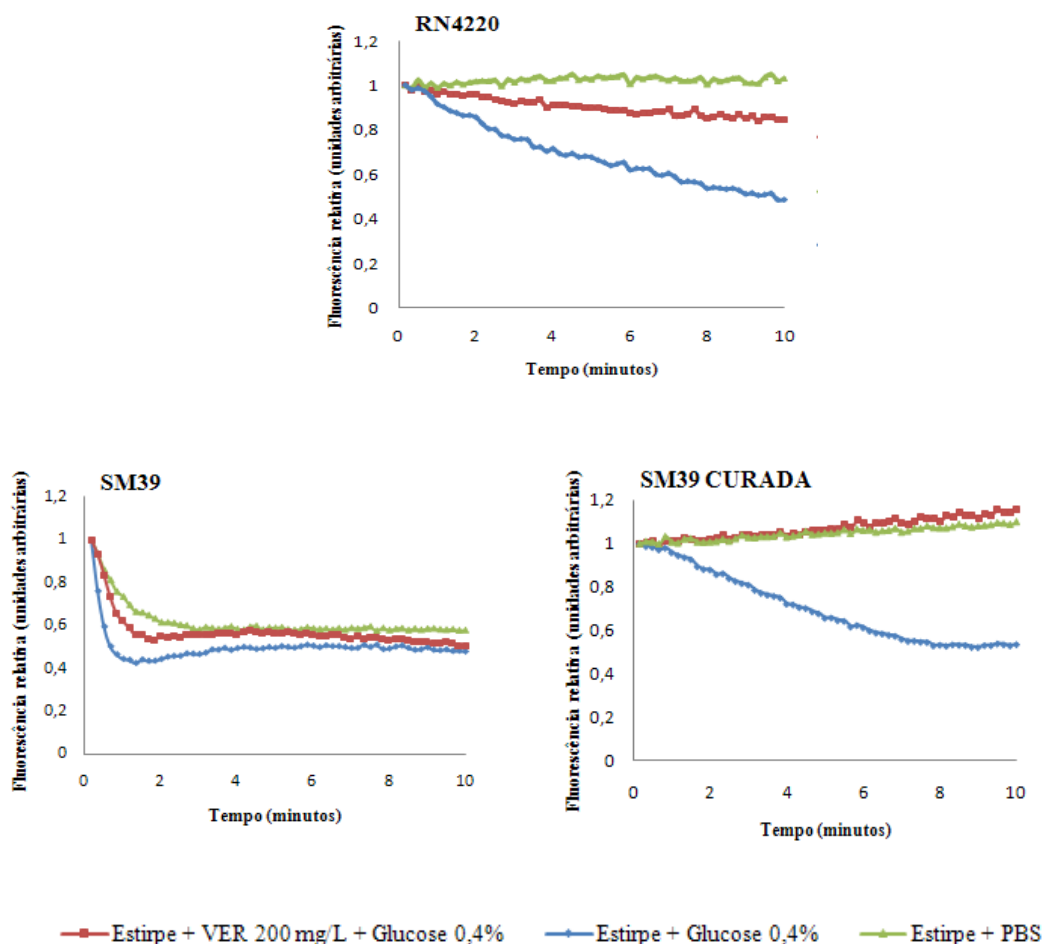


Figura 12. Ensaio de efluxo para as estirpes RN4220, SM39 e SM39 curada, na presença de glucose a 0,4%, com e sem verapamil (VER) à concentração subinibitória de 200 mg/L. Os gráficos apresentados foram normalizados com a condição de não efluxo (ausência de glucose e presença de VER).

Na Figura 12 pode-se observar que a estirpe de referência RN4220 apresenta, tal como esperado, uma actividade de efluxo reduzida, apenas na presença de glucose.

A estirpe SM39 apresenta efluxo acentuado, verificado pela condição máxima de efluxo (estirpe na presença de glucose) e também pela própria estirpe (sem glucose). Verifica-se também que o efeito inibitório do verapamil é praticamente nulo na presença de glucose.

Na estirpe SM39 curada observa-se a presença de efluxo (estirpe na presença de glucose) equivalente ao da estirpe RN4220 e inferior ao da estirpe SM39. No entanto, nesta estirpe não é observada actividade de efluxo na ausência de glucose, verificando-

se também inibição do efluxo nesta estirpe na presença de verapamil e glucose, ao contrário do verificado para a estirpe SM39.

3.2 Estudo da bomba de efluxo Smr

Em estudos anteriores, foi realizada uma caracterização inicial de 53 isolados clínicos de *S. aureus* seleccionados com base no fenótipo de resistência à ciprofloxacina. De entre os 53 isolados clínicos, o gene *smr* foi detectado em apenas um isolado, a estirpe MRSA SM52 (27). O plasmídeo da estirpe SM52 que transporta o gene *smr* foi designado por pSM52. A sequência deste plasmídeo foi determinada e a sua análise revelou que este é um novo membro da família de plasmídeos pC194, que apresenta um único determinante de resistência, o gene *smr*, assim como um duplicado parcial deste gene, Δsmr , de 177 nucleótidos, que codifica uma ΔSmr de 59 aminoácidos em que apenas os primeiros 32 aminoácidos são idênticos à Smr (22).

De forma a estudar a actividade da bomba de efluxo Smr no perfil de susceptibilidade reduzida a biocidas e corantes em *S. aureus* foi realizada a análise da estirpe SM52. Para este estudo procurou-se obter a cura do plasmídeo pSM52, objectivo que não foi alcançado, sendo posteriormente realizada a transferência do pSM52 para uma estirpe susceptível, *S. aureus* RN4220. A importância e o efeito da bomba de efluxo Smr foram avaliados pela caracterização das estirpes SM52, RN4220 e RN4220:pSM52, através da determinação de CMIs e da actividade de efluxo apresentada pelas três estirpes.

3.2.1 Cura do plasmídeo pSM52

A tentativa de cura do plasmídeo da estirpe SM52 teve como objectivo observar qual o efeito do gene *smr* pela comparação do perfil de susceptibilidade apresentado pela estirpe SM52 com o da estirpe SM52 curada, à semelhança da abordagem experimental descrita anteriormente para o estudo da bomba QacA na estirpe SM39. Para isso, foram utilizadas diversas metodologias.

Para a selecção das eventuais colónias sem plasmídeo, as culturas obtidas ao longo dos vários processos de cura testadas foram plaqueadas em placas TSA suplementadas com EtBr, uma vez que sendo este um substrato de amplo espectro das bombas de efluxo e em particular da bomba *Smr*, permite seleccionar colónias fluorescentes (sem plasmídeo) e colónias não fluorescentes (com plasmídeo). Contudo, a cura do plasmídeo não foi obtida por nenhum dos métodos utilizados.

3.2.1.1 Crescimento na presença de CPZ, NOV e PZ

Numa primeira abordagem, seguiu-se o processo de cura de plasmídeo já utilizado com sucesso na estirpe SM39, isto é, crescimento na presença de concentrações crescentes de clorpromazina (CPZ). Neste processo observou-se a presença de várias colónias fluorescentes nas placas TSA suplementadas com EtBr a 2,5 mg/L de algumas passagens. As colónias fluorescentes foram submetidas a extracção de DNA plasmídico e consequente análise da presença do gene *smr* por PCR, verificando-se para todas a presença de DNA plasmídico e de uma banda de 285 pb, correspondente a um fragmento do gene *smr*. As passagens da estirpe SM52 com crescimento na presença de CPZ terminaram na passagem #33 (124 mg/L de CPZ), após a concentração do composto ter ultrapassado o valor da sua CMI, não tendo sido obtida a cura do plasmídeo pSM52. Fez-se nova tentativa de cura, utilizando os compostos novobiocina (NOV), e posteriormente, promazina (PZ), não se tendo obtido novamente a cura do plasmídeo. As passagens da estirpe SM52 na presença de NOV terminaram na passagem #40 (0,4 mg/L NOV), após a concentração do composto ter ultrapassado o valor da sua CMI, e na presença de PZ terminaram na passagem #11 (110 mg/L PZ). As CMIs de CPZ, NOV e PZ obtidas para a estirpe SM52 foram de 50 mg/L, 0,25 mg/L e 256 mg/L, respectivamente. Na Figura 13 pode-se observar a presença da banda de 285 pb correspondente ao gene *smr* nas colónias fluorescentes da passagem #19 com novobiocina.

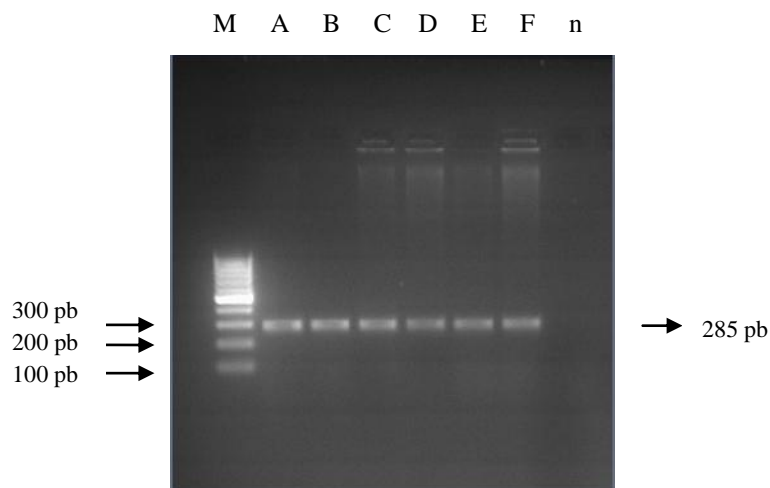


Figura 13. Electroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de amplificação de um fragmento interno ao gene *smr* após extracção de DNA plasmídico extraído das colónias fluorescentes da passagem #19 com novobiocina da estirpe SM52. M: Marcador 100 bp DNA Ladder Plus Gene Ruler; A-F: Colónias fluorescentes F12, F13, F14, F15, F16, F17; n: Controlo negativo.

3.2.1.2 Crescimento a temperaturas elevadas

Uma vez que não foi possível obter a cura do plasmídeo pSM52 por cultura na presença de clorpromazina, novobiocina e promazina, realizou-se de seguida uma nova tentativa de cura pelo crescimento da estirpe SM52 a temperaturas elevadas (42°C, 43°C e 45°C). Como não se obteve crescimento da estirpe SM52 às temperaturas de 43°C e 45°C, o processo foi realizado apenas a 42°C. No plaqueamento em TSA das diluições de todas as passagens da estirpe SM52 a 42°C, observou-se a presença de dois tipos de colónias: colónias amarelas, pequenas (designadas por colónias A) e colónias brancas, maiores (designadas por colónias B). O aparecimento dos dois tipos de colónias poderá corresponder a uma variação fenotípica da estirpe ao ser exposta a temperaturas mais elevadas do que a sua temperatura óptima de crescimento. Da passagem #8 foram seleccionadas, aleatoriamente, 25 colónias do tipo A e 25 colónias do tipo B, que foram repicadas com auxílio de palitos para novas placas de TSA e de TSA suplementado com EtBr a 2,5 mg/L e EtBr a 16 mg/L. A concentração de 16 mg/L de EtBr foi utilizada uma vez que a estirpe SM52 cresce em meio sólido suplementado com esta concentração de EtBr, apesar da sua CMI em meio líquido ser exactamente 16 mg/L. Esta discrepância entre os valores de CMI determinados em meio líquido ou sólido já

foi observada anteriormente (27). Ao analisar uma colónia que exiba aumento da fluorescência nas placas com 2,5 mg/L EtBr e não observando crescimento da colónia correspondente nas placas com 16 mg/L EtBr, seria possível inferir sobre a ausência do plasmídeo pSM52 nessa colónia, uma vez que a estirpe sem o plasmídeo e consequentemente sem o determinante da bomba de efluxo *Smr*, torna-se mais sensível ao EtBr. Como não se observou aumento da fluorescência a 2,5 mg/L de EtBr para nenhuma das 50 colónias repicadas nem ausência de crescimento a 16 mg/L de EtBr, inferiu-se que não ocorreu perda de plasmídeo, não se tendo procedido à extracção de DNA plasmídico e posterior análise da presença do gene *smr* por PCR. As passagens à temperatura de 42°C terminaram na passagem #10.

3.2.1.3 Crescimento na presença de SDS

O processo de cura do plasmídeo da estirpe SM52 pelo crescimento da estirpe na presença de 0,002% SDS foi realizado sete vezes, sem que se conseguisse obter a cura do plasmídeo. As colónias isoladas obtidas nas placas TSA foram seleccionadas e analisadas por “replica plating” em placas de TSA e em placas de TSA com EtBr a 2,5 mg/L e a 16 mg/L, à semelhança do realizado no processo de cura pelo crescimento a temperaturas elevadas. Verificou-se a presença de duas colónias com aumento da fluorescência nas placas de TSA com 2,5 mg/L de EtBr, procedendo-se à extracção de DNA plasmídico e à análise da presença do gene *smr* por PCR. Detectou-se a presença de DNA plasmídico e do gene em ambas as colónias (Figura 14-a).

Por outro lado, nos processos em que houve alguma dificuldade em se seleccionar colónias isoladas nas placas TSA seleccionou-se, aleatoriamente, 25 colónias a serem repicadas com auxílio de palitos conforme descrito anteriormente, verificando-se que em nenhuma delas se conseguiu observar aumento da fluorescência. No entanto, foram analisadas três colónias que não tendo um aumento da fluorescência, apresentaram menor crescimento nas placas TSA com 16 mg/L EtBr. Procedeu-se à análise da presença do gene *smr* por PCR destas, observando-se a presença de DNA plasmídico e do gene em todas as colónias (Figura 14-b).

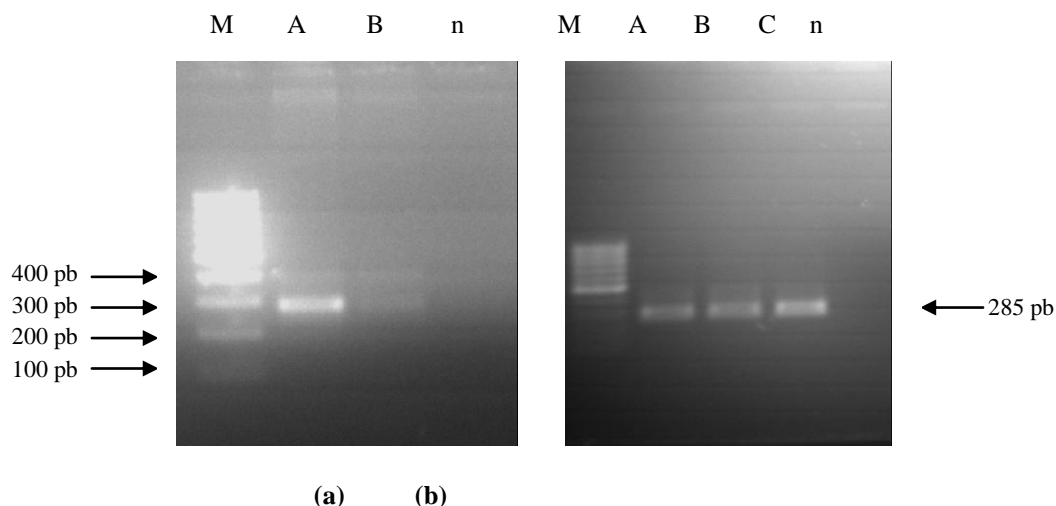


Figura 14. Electroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de amplificação de um fragmento interno ao gene *smr* após extracção de DNA plasmídico extraído das colónias fluorescentes do tratamento com 0,002% SDS. (a) M: Marcador 100 bp DNA Ladder Plus Gene Ruler; A: Colónia 1; B: Colónia 2; n: Controlo negativo. (b) M: Marcador 100 bp DNA Ladder Plus Gene Ruler; A: Colónia 4; B: Colónia 14; C: Colónia 17; n: Controlo negativo.

3.2.1.4 Crescimento na presença de SDS a 42°C

Foi depois testada a cura do plasmídeo pSM52 pelo crescimento simultâneo na presença de SDS e à temperatura de 42°C. À semelhança do que foi observado no processo de crescimento com temperaturas elevadas, verificou-se a presença de dois tipos de colónias com aspectos diferentes, as colónias amarelas pequenas (colónias A) e as colónias brancas maiores (colónias B). Com o auxílio de palitos foram repicadas 25 colónias do tipo A e 25 colónias do tipo B, escolhidas aleatoriamente, que foram analisadas em placas de TSA e TSA com EtBr a 2,5 mg/L e EtBr a 16 mg/L. Não se observou aumento da emissão de fluorescência em nenhuma colónia a 2,5 mg/L de EtBr, nem ausência de crescimento a 16 mg/L de EtBr, não se procedendo à análise do DNA plasmídico. Este método não permitiu obter a cura do plasmídeo.

3.2.1.5 Plaqueamento directo a partir de “stock” a – 80°C

Por último, tentou-se obter a cura do plasmídeo da estirpe SM52 a partir do plaqueamento directo do “stock” mantido a -80°C desta estirpe tal como descrito por Bjorland *et al.* (7) em MHA suplementado com 0,5 mg/L de EtBr. Este processo foi realizado quatro vezes, tendo-se obtido colónias fluorescentes. Todas as colónias fluorescentes obtidas foram analisadas através da extracção de DNA plasmídico e PCR para o gene *smr*. No entanto, em todas elas houve a detecção de DNA plasmídico e do gene. Na Figura 15 observa-se a análise das 11 colónias fluorescentes obtidas com este método, comprovando a presença do gene *smr* em todas.

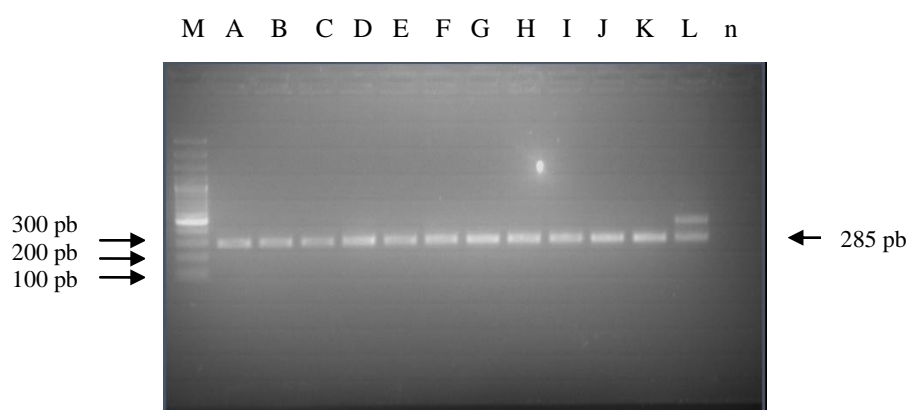


Figura 15. Electroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de amplificação de um fragmento interno ao gene *smr* após extracção de DNA plasmídico extraído das colónias fluorescentes do processo de cura pelo plaqueamento directo a partir de “stock” a – 80°C. **M:** Marcador 100 bp DNA Ladder Plus Gene Ruler; **A-K:** Colónias fluorescentes 2A, 2B, 2D, 3A, 3B, 3C, 4A, 6A, 7A, 8A, 10A; **L:** Estirpe SM52: para esta última verifica-se a amplificação de duas bandas, correspondentes ao gene *smr* e ao seu duplicado, Δsmr ; **n:** Controlo negativo.

3.2.2 Electrotransformação da estirpe RN4220 com o plasmídeo pSM52

De forma a analisar o efeito do gene *smr* numa estirpe susceptível, procedeu-se à transferência do plasmídeo pSM52 para a estirpe RN4220, que apresenta um perfil de susceptibilidade aos antibióticos.

Na electrotransformação da estirpe RN4220 com o plasmídeo pSM52 foi possível detectar a presença de quatro colónias em placas de PA com 5 mg/L de EtBr, agente de

selecção, ao fim de 36 horas de incubação, não se observando crescimento das células RN4220 competentes nas placas controlo. As quatro colónias obtidas, designadas de 1 a 4, foram depois inoculadas em meio PB sem agente de selecção e em meio com 5 mg/L de EtBr de forma a serem analisadas por extracção de DNA plasmídico e pesquisa do gene *smr* por PCR. As quatro culturas em meio PB sem EtBr cresceram ao final de 18 horas, enquanto as culturas inoculadas com colónias 1 e 4 apresentaram crescimento em meio com EtBr ao final de 48 e 56 horas, respectivamente. Não houve crescimento das colónias 2 e 3 inoculadas em meio com EtBr a 5 mg/L. Em todas as culturas analisadas detectou-se a presença do gene *smr* por PCR (Figura 16).

A cultura preparada a partir da inoculação da colónia 1 em meio PB sem EtBr foi a escolhida para ser caracterizada nos passos seguintes, de determinação de CMIs e ensaios fluorométricos, passando a ser designada por RN4220:pSM52.

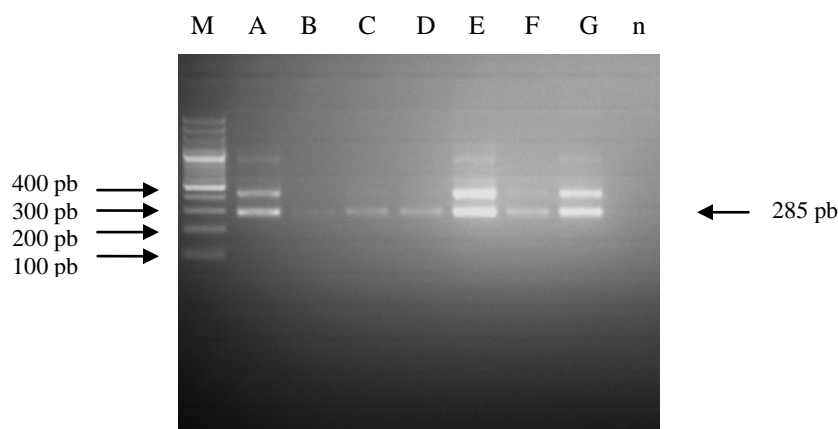


Figura 16. Electroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de amplificação de um fragmento interno ao gene *smr* após extracção de DNA plasmídico extraído das quatro colónias resultantes da electrotransformação de RN4220 com o pSM52. **M:** Marcador 100 bp DNA Ladder Plus Gene Ruler; **A:** Colónia 1; **B:** Colónia 1 (meio com EtBr a 5 mg/L); **C:** Colónia 2; **D:** Colónia 3; **E:** Colónia 4; **F:** Colónia 4 (meio com EtBr a 5 mg/L); **G:** Estirpe SM52; **n:** Controlo negativo. Em alguns casos observa-se a amplificação de duas bandas, correspondentes ao gene *smr* e ao seu duplicado Δsmr (ver Figura 15).

A tipagem por PFGE das estirpes SM52, RN4220 e RN4220:pSM52 permitiu garantir a pureza das estirpes ao longo do trabalho, já que a estirpe RN4220:pSM52 apresenta um perfil de macro-restrição idêntico à estirpe RN4220 (Figura 17), eliminando deste modo a possibilidade de ter ocorrido contaminação durante a transformação.

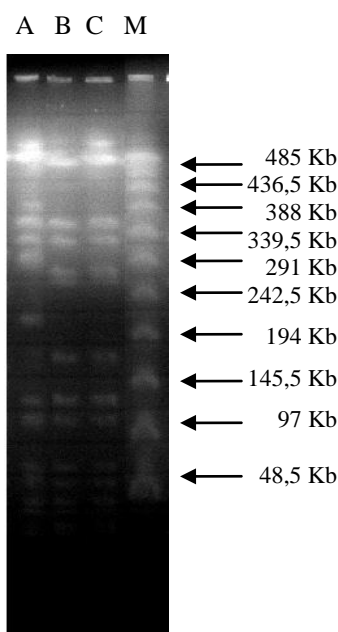


Figura 17. Electroforese em gel de agarose SeaKem LE a 1% dos produtos de macro-restrição com *SmaI* por PFGE. A: SM52; B: RN4220; C: RN4220:pSM52; M: Marcador lambda Ladder PFGE.

3.2.3 Caracterização das estirpes SM52, RN4220, RN4220:pSM52

3.2.3.1 Determinação de concentrações mínimas inibitórias de compostos antimicrobianos e de inibidores de efluxo

– Concentração mínima inibitória de compostos antimicrobianos

O perfil de susceptibilidade a vários compostos antimicrobianos das estirpes SM52, RN4220 e RN4220:pSM52 foi obtido pela determinação da concentração mínima inibitória de diferentes biocidas, corantes e antibióticos, já anteriormente testados no estudo da bomba de efluxo QacA.

Os valores de CMIs de cada composto para as estirpes em estudo são apresentados na Tabela 19 e correspondem ao resultado de três ensaios independentes concordantes.

Tabela 19. Valores de CMIs de diferentes compostos antimicrobianos para as estirpes SM52, RN4220 e RN4220:pSM52.

Composto	CMIs (mg/L)		
	SM52	RN4220	RN4220:pSM52
Biocidas e Corantes			
EtBr	16	2	8
CV	0,06	0,125	0,125
ACR	16	8	8
TPP	16	8	8
CTAB	8	2	16
CET	8	2	16
BAC	2	1	2
CPC	2	0,5	4
BERB	>256	64	>256
DC	1	1	1
CHX	0,5	0,5	0,5
PT	16	8	8
Antibióticos ^(a)			
CIP	16 (R)	0,25 (S)	0,25 (S)
NOR	64 (R)	1 (S)	1 (S)
LEV	8 (R)	0,25 (S)	0,25 (S)
SPX	16 (R)	0,125 (S)	0,125 (S)
OXA	8 (R)	0,125 (S)	0,125 (S)
AMP	8 (R)	0,125 (S)	0,125 (S)
PEN	16 (R)	0,008 (S)	0,008 (S)
VAN	2 (S)	1 (S)	1 (S)
GEN	1 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)
KAN	512 (R)	4 (S)	4 (S)
ERY	0,5 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)
TET	0,25 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)
CHL	32 (R)	4 (S)	8 (S)

EtBr: brometo de etídeo; CV: violeta de cristal; ACR: acriflavina; TPP: brometo de tetrafenilfosfônio; CTAB: brometo de hexadeciltrimetilamônio; CET: cetrimida; BAC: cloreto de benzalcônio; CPC: cloreto de cetilpiridínio; BERB: berberina; DC: cloreto de dequalínio; CHX: clorexidina; PT: pentamidina; CIP: ciprofloxacina; NOR: norfloxacina; LEV: levofloxacina; SPX: sparfloxacina; OXA: oxacilina; AMP: ampicilina; PEN: penicilina; VAN: vancomicina; GEN: gentamicina; KAN: canamicina; ERY: eritromicina; TET: tetraciclina; CHL: cloranfenicol. ^(a) S: sensível; R: resistente, de acordo com os “breakpoints” definidos pelas normas CLSI (18).

A estirpe RN4220 apresenta um perfil de susceptibilidade a todos os antibióticos testados e valores de CMIs baixos para os vários biocidas e corantes utilizados (Tabela 19).

Por outro lado, a estirpe SM52, que possui o plasmídeo pSM52 com o determinante *smr*, apresenta um perfil de susceptibilidade reduzida aos biocidas e corantes testados,

sendo os valores de CMIs da maioria destes compostos superiores aos apresentados pela estirpe RN4220 (Tabela 19). A estirpe SM52 apresenta também um fenótipo de resistência aos antibióticos fluoroquinolonas, β -lactâmicos, canamicina e cloranfenicol, sendo sensível aos restantes antibióticos testados.

A estirpe RN4220:pSM52, electrotransformada com o plasmídeo pSM52 apresenta um perfil de susceptibilidade reduzida aos biocidas e corantes testados, em que os valores de CMIs são superiores aos apresentados pela estirpe RN4220 e semelhantes aos da estirpe SM52 em particular para os compostos brometo de etídeo, brometo de hexadeciltrimetilamónio, ceftriaxona, cloreto de benzalcónio, cloreto de cetilpiridínio e berberina. Ao nível do perfil de susceptibilidade aos antibióticos, a estirpe RN4220:pSM52 apresenta valores de CMIs idênticos à RN4220, sendo sensível a todos os antibióticos testados.

– Concentração mínima inibitória de inibidores de efluxo

Os valores de CMIs dos inibidores de efluxo obtidos foram iguais para todas as estirpes em estudo e encontram-se descritos na Tabela 20.

As concentrações de tioridazina, clorpromazina, reserpina e verapamil utilizadas para a determinação de CMIs e nos ensaios de fluorimetria, correspondentes a ½ da CMI ou inferior a esta, de modo a garantir que a sua presença não interfere com a viabilidade celular, encontram-se descritas na Tabela 20.

Tabela 20. Valores de CMIs de inibidores de efluxo para as estirpes em estudo.

Inibidor de efluxo	CMI (mg/L) ^(a)	Concentração utilizada (mg/L) ^(b)
TZ	25	12,5
CPZ	50	25
VER	>400	200
RES	>40	20

TZ: tioridazina; CPZ: clorpromazina; VER: verapamil; RES: reserpina.

^(a) Os valores são iguais para as estirpes SM52, RN4220 e RN4220:pSM52.

^(b) Concentração de inibidor utilizada na determinação de CMIs dos compostos antimicrobianos na presença de inibidores e nos ensaios de fluorimetria.

– **Concentração mínima inibitória de compostos antimicrobianos na presença de inibidores de efluxo**

Para determinar o efeito dos inibidores de efluxo na actividade da bomba de efluxo Smr, foram determinados os valores de CMIs para o mesmo conjunto de compostos antimicrobianos testados anteriormente, na presença dos inibidores tioridazina, clorpromazina, verapamil e reserpina, com excepção dos antibióticos vancomicina, gentamicina, canamicina, eritromicina, tetraciclina e cloranfenicol.

Os valores de CMIs de cada composto para as estirpes em estudo na presença dos inibidores de efluxo são apresentados na Tabela 21 e correspondem ao resultado de três ensaios independentes concordantes.

Tabela 21. Valores de CMIs de compostos antimicrobianos na ausência e presença de inibidores de efluxo para as estirpes SM52, RN4220 e RN4220:pSM52.

Composto	CMIs (mg/L)														
	SM52					RN4220					RN4220:pSM52				
	Sem IE	TZ	CPZ	VER	RES	Sem IE	TZ	CPZ	VER	RES	Sem IE	TZ	CPZ	VER	RES
Biocidas e Corantes															
EtBr	16	2	≤0,5	2	4	2	0,125	0,125	0,25	0,25	8	0,25	2	1	2
CV	0,06	0,03	0,06	0,06	0,125	0,125	0,004	0,004	0,03	0,004	0,125	0,008	0,01	0,03	0,008
ACR	16	4	1	4	4	8	1	1	2	2	8	1	1	2	4
TPP	16	2	8	4	8	8	0,25	0,25	2	0,5	8	0,25	0,5	2	1
CTAB	8	1	4	4	2	2	0,03	0,03	0,25	0,125	16	≤0,06	≤0,06	1	2
CET	8	0,5	4	4	4	2	0,06	0,06	0,06	0,06	16	≤0,06	≤0,06	2	1
BAC	2	0,25	2	1	2	1	≤0,01	≤0,01	0,03	≤0,01	2	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125
CPC	2	1	1	0,5	1	0,5	≤0,004	0,008	0,03	0,06	4	≤0,01	≤0,01	0,06	1
BERB	>256	256	256	256	256	64	16	16	16	32	>256	128	128	>256	>256
DC	1	0,5	0,5	0,5	0,5	1	0,01	0,5	0,25	0,125	1	0,125	0,125	0,25	0,125
CHX	0,5	0,125	0,25	0,125	0,25	0,5	0,008	0,03	0,03	0,03	0,5	0,01	0,03	0,06	0,03
PT	16	8	8	8	16	8	2	2	4	8	8	2	2	4	8
Antibióticos															
CIP	16	8	8	8	8	0,25	0,125	0,125	0,125	0,25	0,25	0,125	0,125	0,125	0,125
NOR	64	64	64	64	64	1	0,25	0,25	0,25	0,25	1	0,25	0,25	0,25	0,5
LEV	8	8	8	8	8	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,125	0,25	0,125	0,125
SPX	16	16	8	8	8	0,125	0,06	0,06	0,06	0,06	0,125	0,125	0,125	0,06	0,06
OXA	8	0,25	4	4	4	0,125	0,01	0,03	0,06	0,06	0,125	0,01	0,03	0,06	0,06
AMP	8	2	8	8	8	0,125	0,03	0,03	0,06	0,06	0,125	0,03	0,03	0,06	0,03
PEN	16	1	4	2	2	0,008	≤0,002	0,004	0,004	0,008	0,008	≤0,002	≤0,002	0,004	0,008

EtBr: brometo de etídeo; CV: violeta de cristal; ACR: acriflavina; TPP: brometo de tetrafenilfosfônio; CTAB: brometo de hexadeciltrimetilamônio; CET: cetrimida; BAC: cloreto de benzalcônio; CPC: cloreto de cetilpiridínio; BERB: berberina; DC: cloreto de dequalínio; CHX: clorexidina; PT: pentamidina; CIP: ciprofloxacina; NOR: norfloxacina; LEV: levofloxacina; SPX: sparfloxacina; OXA: oxacilina; AMP: ampicilina; PEN: penicilina; VAN: vancomicina; GEN: gentamicina; KAN: canamicina; ERY: eritromicina; TET: tetraciclina; CHL: cloranfenicol; TZ: tioridazina; CPZ: clorpromazina; VER: verapamil; RES: reserpina. Os valores a negrito correspondem aqueles em que ocorreu uma diminuição de CMI para pelo menos um quarto do seu valor original (24). Os IEs foram utilizados a metade (ou abaixo) do seu valor de CMI para cada estirpe, sendo as concentrações utilizadas: 12,5 mg/L de TZ; 25 mg/L de CPZ; 200 mg/L de VER e 20 mg/L de RES.

Na Tabela 21 pode-se observar que dos inibidores de efluxo testados, a tioridazina e a clorpromazina foram os que apresentaram maior efeito inibitório, sendo os mais eficazes em reduzir os valores de CMI de alguns biocidas e corantes para a estirpe SM52 e de praticamente todos os biocidas e corantes testados para as estirpes RN4220:pSM52 e RN4220. Os inibidores verapamil e reserpina apresentaram um efeito inibitório menor ou por vezes ausente na redução dos valores de CMIs, nomeadamente na estirpe SM52. Na estirpe SM52 verifica-se a redução dos valores de CMIs na presença de tioridazina e clorpromazina de 4 a 16 vezes para os biocidas e corantes brometo de etídeo, acriflavina, brometo de tetrafenilfosfónio, brometo de hexadeciltrimetilamónio, cetrimida, cloreto de benzalcónio e clorexidina. Os valores de CMIs desta estirpe na presença dos inibidores são reduzidos para valores próximos dos apresentados pela estirpe RN4220 (na ausência de inibidores), que apresenta reduções de CMIs de 4 a 125 vezes para o mesmo conjunto de compostos. Porém, na estirpe RN4220:pSM52, observa-se uma maior da redução de CMIs na presença de tioridazina e clorpromazina, e superior ao observado na estirpe SM52, ocorrendo uma diminuição de CMIs de 4 a 400 vezes, principalmente nos compostos cloreto de cetilpiridínio, cetrimida e brometo de hexadeciltrimetilamónio.

Observou-se também uma redução dos valores de CMIs dos antibióticos β -lactâmicos na presença de tioridazina e clorpromazina para todas as estirpes.

3.2.3.2 Detecção de efluxo por fluorometria em tempo-real

Neste trabalho, utilizou-se um método fluorométrico semi-automático já anteriormente referido no ponto 3.1.2.3 para a monitorização do transporte de um substrato de bombas de efluxo, o EtBr, para avaliar a actividade de efluxo das estirpes SM52, RN4220 e RN4220:pSM52 e compará-las em termos de presença ou ausência do determinante da Smr.

– Ensaios de acumulação de EtBr

Os ensaios de acumulação de EtBr foram realizados de forma a determinar qual a concentração de EtBr a partir da qual se começa a detectar a sua acumulação nas

células. Esta concentração de EtBr será depois a utilizada nos ensaios posteriores. Para isso, as estirpes em estudo foram expostas a concentrações crescentes de EtBr, de 0,25 mg/L a 4 mg/L.

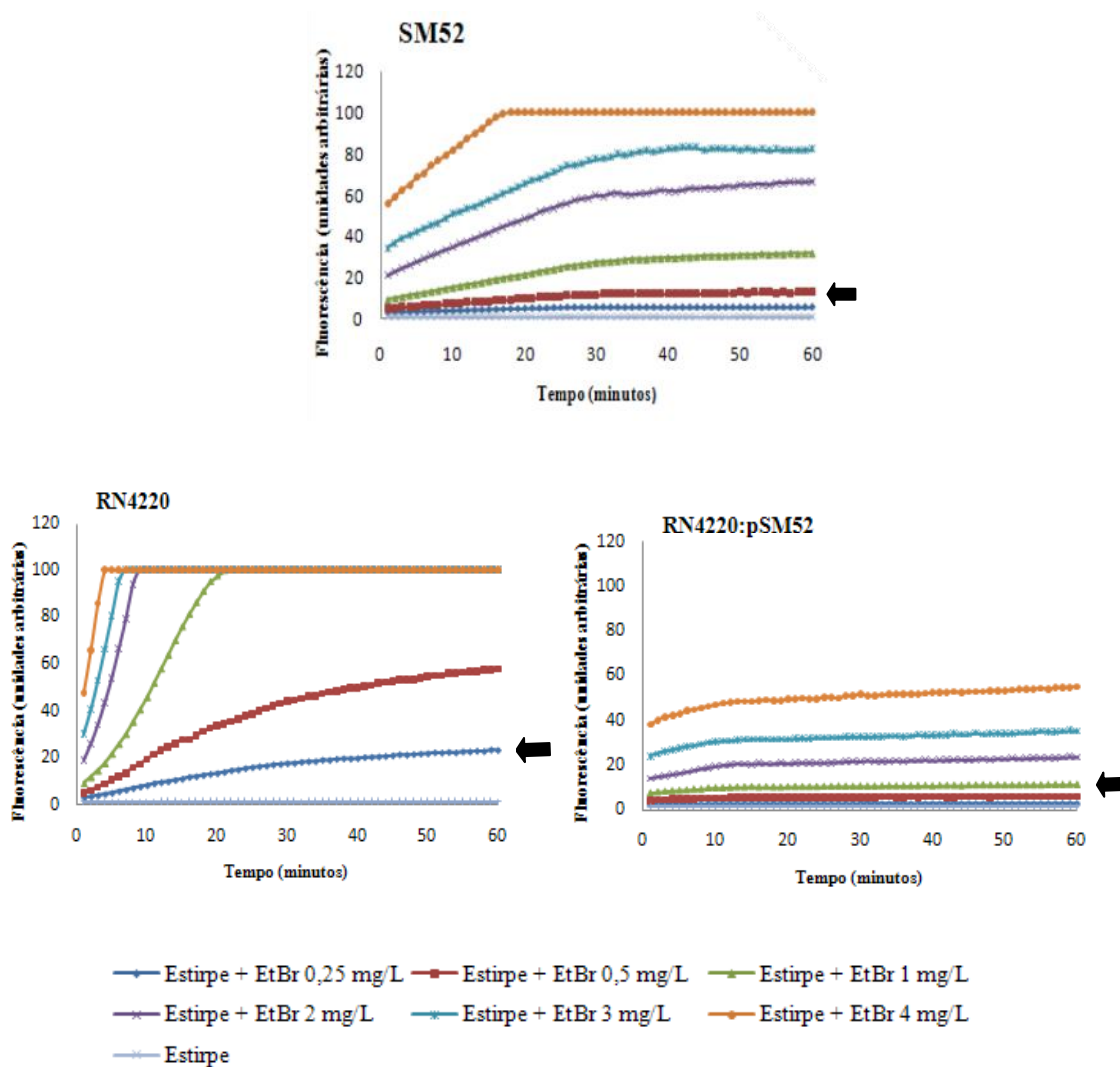


Figura 18. Ensaio de acumulação de EtBr para as estirpes SM52, RN4220 e RN4220:pSM52 na presença de concentrações crescentes de EtBr. As setas nos gráficos indicam a concentração de EtBr a partir da qual se detecta acumulação para cada estirpe.

Na Figura 18 pode-se observar que a estirpe RN4220 apresenta acumulação máxima de EtBr ao fim dos primeiros minutos de ensaio com 2, 3 e 4 mg/L de EtBr, sendo necessária uma menor concentração deste composto para se detectar acumulação.

A estirpe SM52 apresenta a bomba de efluxo *Smr*, tendo por isso maior capacidade para extrusar o EtBr e como tal menor acumulação deste nas células. Na Figura 18 observa-se que a estirpe SM52 apresenta níveis de fluorescência inferiores ao da estirpe RN4220, sendo necessária uma concentração mais elevada de EtBr para se detectar acumulação. Em particular, esta estirpe só atinge os níveis de acumulação máxima detectável com 4 mg/L de EtBr

A estirpe RN4220:pSM52, em relação à estirpe RN4220, apresenta maior capacidade para extrusar o EtBr, sendo menor a acumulação de EtBr dentro das células. A estirpe RN4220:pSM52 apresenta uma baixa acumulação de EtBr (50 unidades arbitrárias de fluorescência) ao longo do ensaio que se mantém constante, sendo necessária uma concentração mais elevada de EtBr para se detectar acumulação. Os níveis de fluorescência da estirpe electrotransformada com o pSM52 (gene *smr*) são inferiores aos observados na estirpe de referência RN4220 e mesmo aos observados para a estirpe SM52 (Figura 18).

De acordo com os resultados obtidos (Figura 18), as concentrações de EtBr escolhidas para os ensaios seguintes foram de 0,25 mg/L para a estirpe RN4220, 0,5 mg/L para a estirpe SM52 e 1 mg/L para a estirpe RN4220:pSM52.

– Ensaios de acumulação com inibidores de efluxo

Os ensaios de acumulação na presença de inibidores de efluxo foram realizados como forma de seleccionar o inibidor mais eficaz, ou seja, aquele que ao inibir o efluxo permite maior acumulação de EtBr nas células. A concentração de EtBr escolhida para cada estirpe foi a determinada anteriormente nos ensaios de acumulação. A concentração de cada inibidor utilizada no ensaio foi metade do valor da sua CMI ou inferior a esta (Figura 19).

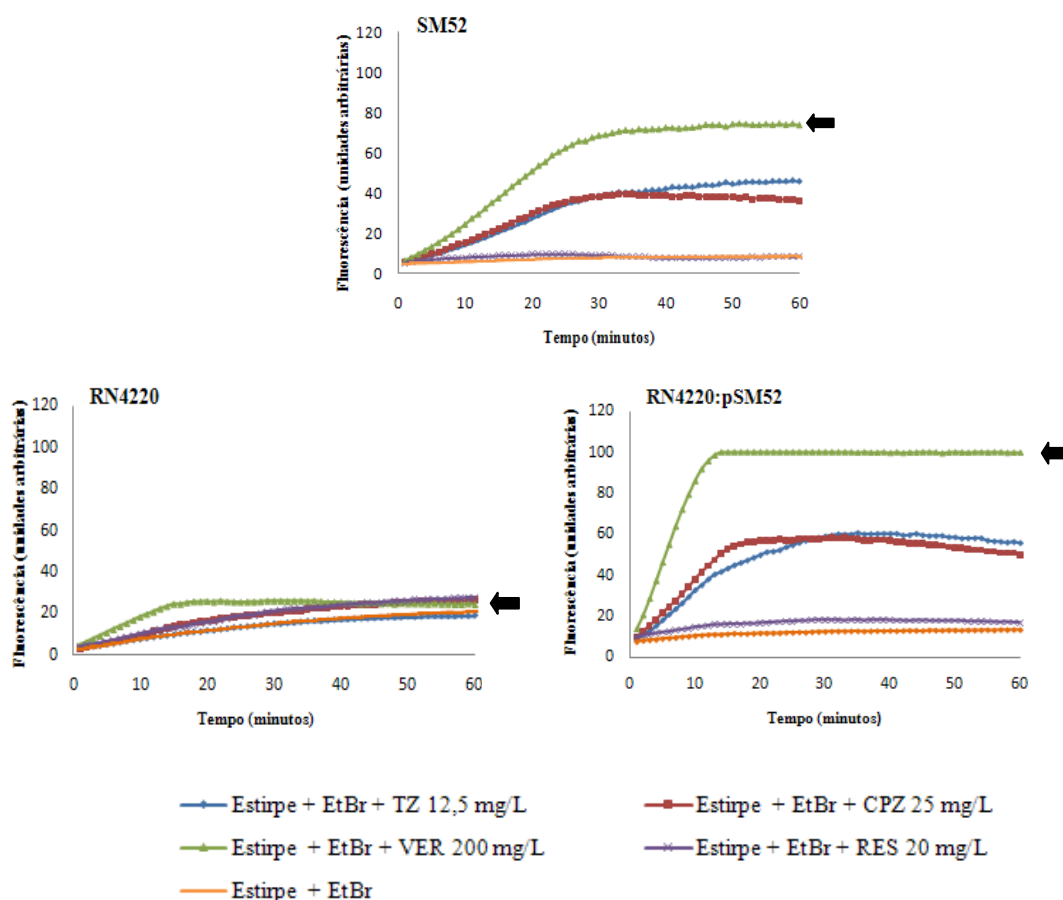


Figura 19. Ensaios de acumulação de EtBr para as estirpes SM52, RN4220 e RN4220:pSM52, na presença de concentrações subinibitórias de inibidores de efluxo. As concentrações de EtBr utilizadas para cada estirpe foram de 0,25 mg/L (RN4220), 0,5 mg/L (SM52) e 1 mg/L (RN4220:pSM52). As setas indicam o inibidor mais eficaz para cada estirpe.

Pela Figura 19 observa-se que para todas as estirpes em estudo houve maior acumulação de EtBr na presença de verapamil, sendo este o inibidor que demonstrou maior eficácia, quando comparado com os outros inibidores testados.

A estirpe RN4220 não apresenta um aumento significativo da acumulação de EtBr na presença dos inibidores, verificando-se que os níveis de acumulação de EtBr mantiveram-se baixos (20 a 30 unidades arbitrárias de fluorescência) ao longo do ensaio. No entanto, na presença de verapamil observa-se uma acumulação de EtBr ligeiramente superior em comparação com os outros inibidores.

Por outro lado, as estirpes SM52 e RN4220:pSM52 demonstraram maior acumulação de EtBr na presença de inibidores, em particular de tioridazina,

clorpromazina e verapamil, com um efeito mais pronunciado no caso da RN4220:pSM52. Destes três compostos, o verapamil foi aquele que demonstrou maior efeito.

– **Ensaaios de efluxo**

Os ensaios de efluxo foram realizados de acordo com os parâmetros (concentração de EtBr e inibidor) estabelecidos nos ensaios anteriores para cada estirpe. As condições necessárias para a realização destes ensaios incluem a presença de glucose, que proporciona a condição máxima de efluxo, e a presença de inibidor de efluxo, que proporciona a condição mínima de efluxo. O inibidor utilizado nestes ensaios foi o verapamil por ter sido aquele que demonstrou maior efeito nos ensaios de acumulação. Os ensaios de efluxo para as estirpes SM52, RN4220 e RN4220:pSM52 encontram-se apresentados na Figura 20.

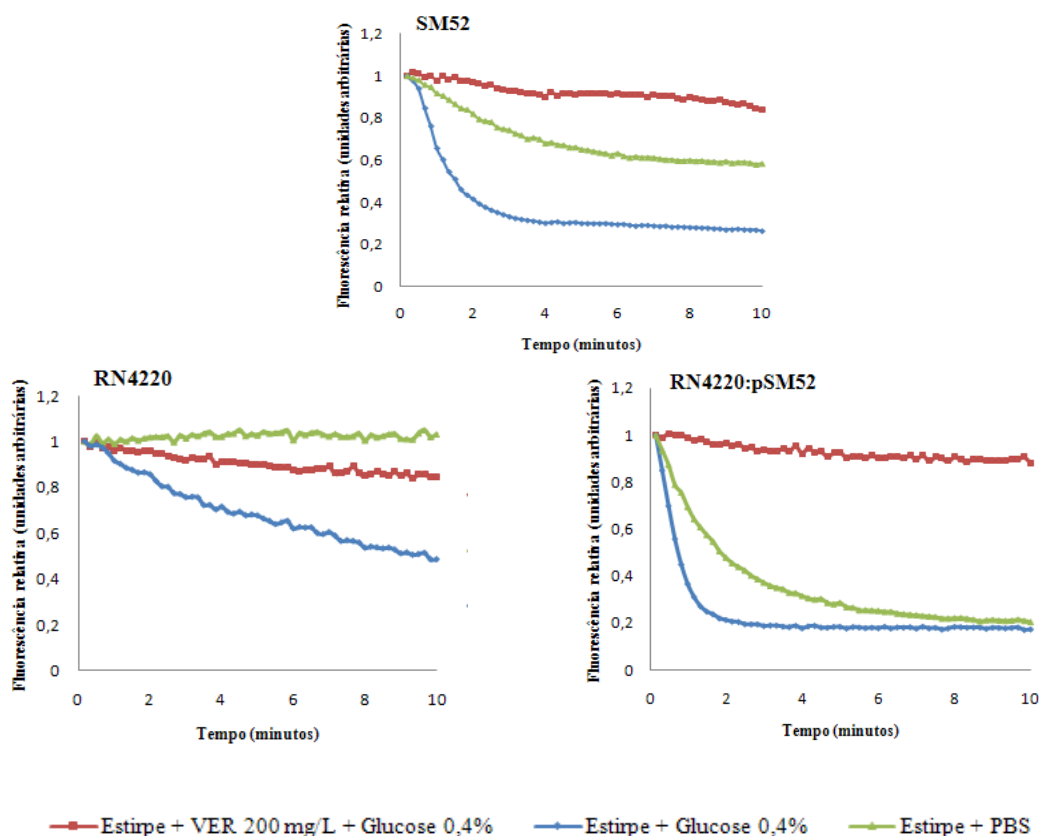


Figura 20. Ensaio de efluxo para as estirpes SM52, RN4220 e RN4220:pSM52, na presença de glucose a 0,4%, com ou sem verapamil (VER) à concentração subinibitória de 200 mg/L. Os gráficos apresentados foram normalizados a partir dos obtidos em condições de não efluxo (ausência de glucose e presença de VER).

Na Figura 20 pode-se observar que a estirpe RN4220 não apresenta actividade de efluxo considerável, havendo uma redução da fluorescência relativa ao longo do tempo apenas na presença de glucose.

Por outro lado, as estirpes SM52 e RN4220:pSM52 apresentam actividade de efluxo significativa, verificada pela condição máxima de efluxo (estirpe na presença de glucose), sendo esta mais acentuada quando comparada com a estirpe de referência RN4220. Nestas estirpes verifica-se também inibição do efluxo na presença de verapamil e glucose.

4 Discussão e Conclusões

O aumento dramático da incidência de infecções nosocomiais causadas por estirpes de *S. aureus* multirresistentes, em particular de estirpes MRSA, constitui um problema grave com algumas estirpes a apresentarem resistência a pelo menos 20 classes de compostos antimicrobianos distintos, incluindo biocidas anti-sépticos e desinfectantes (12). A utilização destes compostos biocidas tem desempenhado um papel de grande relevância nos procedimentos de controlo e prevenção de infecções hospitalares, nomeadamente no controlo de infecções causadas por estirpes MRSA (19, 62, 105). Um dos mecanismos utilizados pelas bactérias para escapar aos efeitos tóxicos destes compostos antimicrobianos é através da acção de bombas de efluxo que possuem uma vasta gama de substratos, ditas bombas de efluxo MDR. Estas bombas de efluxo MDR têm a capacidade de reconhecer e extrusar da célula compostos que são química e estruturalmente distintos, impedindo-os de atingir os seus alvos e assim exercer o seu efeito nocivo.

Em *S. aureus*, encontram-se já descritos um número significativo de tais sistemas de efluxo, cujos determinantes se encontram quer no cromossoma de *S. aureus* quer em plasmídeos (90). De entre estes, os sistemas de efluxo que são codificados em plasmídeos são de particular interesse, devido não somente à mobilidade intra-espécie e inter-espécie dos plasmídeos, mas também ao facto de poderem transportar determinantes de resistência adicionais (63, 106). Torna-se assim relevante o estudo de sistemas de efluxo como QacA e Smr, e também dos plasmídeos que os transportam, bem como a avaliação da sua contribuição para fenótipos de multirresistência em estirpes MRSA.

Deste modo, foi objectivo principal deste trabalho estudar a importância e o efeito das bombas de efluxo QacA e Smr no perfil de susceptibilidade reduzida a biocidas, corantes e antibióticos de duas estirpes MRSA multirresistentes, SM39 e SM52, isoladas num hospital de Lisboa e que transportam os genes *qacA* e *smr* nos plasmídeos pSM39 e pSM52, respectivamente. Para poder fazer inferências directas sobre o efeito destas bombas de efluxo, há a necessidade de estudá-las num grupo de estirpes isogénicas, ou seja, com o mesmo “background” genético. Assim, esta análise foi realizada através da determinação e comparação de valores de CMI de um conjunto de

biocidas, corantes e antibióticos e da actividade de efluxo por fluorometria em tempo real entre as estirpes SM39 e SM39 curada e entre as estirpes RN4220 e RN4220:pSM52, em comparação também com a estirpe SM52.

– Estudo da bomba de efluxo QacA no perfil de susceptibilidade a biocidas e corantes

O estudo da bomba de efluxo QacA teve como objectivo inicial a obtenção da estirpe SM39 curada do plasmídeo pSM39, de forma a inferir, por comparação entre as estirpes isogénicas SM39 e a sua derivada curada, a contribuição do plasmídeo pSM39 e da bomba QacA para o fenótipo de resistência a diferentes compostos antimicrobianos em *S. aureus*. O método de cura do plasmídeo pSM39 por passagens em meio suplementado com clorpromazina, já anteriormente utilizado para cura de plasmídeos de *S. aureus* (20) demonstrou ser eficaz na cura deste plasmídeo, com a obtenção da estirpe SM39 curada ao fim de sete passagens.

A comparação dos perfis de susceptibilidade das estirpes SM39 e SM39 curada demonstra que a presença do plasmídeo pSM39, e consequentemente a actividade de efluxo mediada pela bomba QacA, tem um papel importante na susceptibilidade reduzida a todos os biocidas e corantes testados na estirpe SM39, uma vez que a estirpe SM39 curada (sem o plasmídeo pSM39) apresenta valores de CMIs destes compostos muito inferiores aos da estirpe SM39 (Tabela 16 – Resultados). De entre estes compostos, encontram-se os compostos catiónicos monovalentes, como os QACs brometo de hexadeciltrimetilamónio, cloreto de benzalcónio, cetrimida e brometo de tetrafenilfosfónio e os corantes brometo de etídeo e acriflavina e compostos catiónicos divalentes, como o cloreto de dequalínio e a pentamidina. Estes resultados estão de acordo com os descritos na literatura para substratos da bomba de efluxo QacA (11). Assim, pode-se inferir que o mecanismo subjacente ao perfil de susceptibilidade reduzida a biocidas e corantes na estirpe SM39 será a actividade de efluxo mediada pela bomba QacA. A determinação de CMIs destes compostos antimicrobianos na presença de moléculas descritas como inibidores de efluxo permitiu comprovar que o efluxo é o componente principal da resistência a estes biocidas e corantes na estirpe SM39, sendo as fenotiazinas tioridazina e clorpromazina, os inibidores com maior efeito inibitório,

promovendo reduções significativas dos valores de CMIs (Tabela 18 - Resultados). Todavia, nas estirpes RN4220 e SM39 curada também se verificou redução de CMIs dos biocidas e corantes na presença destes inibidores, o que poderá ser explicado pela acção destes compostos na actividade de efluxo basal presente nestas estirpes, assegurada pelas bombas cromossómicas que partilham estes biocidas e corantes como substratos, nomeadamente, NorA, NorB, MepA, MdeA e SepA (42, 46, 75, 114).

Uma das questões que permanece em discussão na utilização de compostos biocidas é a metodologia aplicada para a determinação da sua actividade antimicrobiana. Para além da determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMIs), tem sido também utilizada a determinação de concentrações mínimas bactericidas (CMBs) a diferentes tempos de exposição (59, 76) ou a realização de testes de suspensão “Time-kill” (64). Neste trabalho, optou-se por determinar as CMIs de cada biocida para cada uma das culturas bacterianas em análise, assim como realizado em estudos anteriores (20, 23, 81, 118), o que permitiu também avaliar o efeito dos inibidores de efluxo utilizados neste estudo.

Para confirmar e avaliar a presença de actividade de efluxo nas estirpes em estudo, foi utilizada fluorometria em tempo-real, de forma a analisar a sua capacidade de extrusão do brometo de etídeo, e assim poder inferir sobre a contribuição da bomba de efluxo QacA para esse mesmo efluxo. Os resultados obtidos nos ensaios de acumulação permitiram verificar que a estirpe SM39 é a que apresenta menor acumulação de EtBr, e que esta acumulação de EtBr é a que sofre um aumento mais significativo na presença do inibidor mais eficaz, o verapamil (Figura 11 - Resultados). Por sua vez, os ensaios de efluxo demonstraram que SM39 é a estirpe que apresenta a actividade de efluxo do EtBr mais pronunciada, e que esta actividade é independente da glucose. Verificou-se ainda que na presença de glucose, o efeito do verapamil sobre esta actividade de efluxo é nulo (Figura 12 - Resultados). Os resultados obtidos para as estirpes RN4220 e SM39 curada indicam, tal como a determinação de CMIs na presença de inibidores de efluxo, que ambas as estirpes possuem uma actividade de efluxo basal. Apesar das estirpes RN4220 e SM39 curada apresentarem acumulação significativa de EtBr e efluxo basal de EtBr a actividade de efluxo é dependente da glucose, e na sua presença, o verapamil tem a capacidade de inibir o efluxo de EtBr (Figura 12 - Resultados).

Com este estudo também se pode observar que os inibidores de efluxo com maior efeito na redução das CMIs foram a tioridazina e a clorpromazina, ao contrário do observado nos ensaios de fluorimetria, em que o verapamil foi o inibidor que demonstrou ter maior eficácia na acumulação/extrusão de EtBr. Estes resultados devem-se provavelmente a diferenças nos mecanismos de acção de cada inibidor, assim como às características de cada método. Os ensaios fluorométricos ocorrem num curto espaço de tempo (10 a 60 min), em que se analisa o efeito imediato do inibidor em tempo real, na própria suspensão celular, enquanto nos ensaios de determinação de CMIs, avalia-se o efeito dos inibidores ao longo do crescimento de uma cultura, durante 18 horas. Estes resultados já tinham sido anteriormente descritos, tanto para *S. aureus* (20, 21, 23) como para outras bactérias, nomeadamente *Mycobacterium smegmatis* (100). No que respeita ao inibidor reserpina, os resultados obtidos indicam, ao contrário do descrito na literatura (72), que esta não tem um efeito inibitório significativo no efluxo mediado pela QacA.

Em suma, os dados apresentados até ao momento mostraram o envolvimento do efluxo mediado pela bomba QacA no perfil de susceptibilidade reduzida a biocidas e corantes na estirpe MRSA SM39. Mostraram também que, para além de QacA, existe actividade de efluxo mediada por bombas de efluxo cujos determinantes se encontram no cromossoma de *S. aureus*.

– Estudo da bomba de efluxo QacA no perfil de susceptibilidade a antibióticos

Relativamente ao perfil de susceptibilidade aos antibióticos, a estirpe SM39 apresenta um fenótipo de resistência aos β -lactâmicos oxacilina, ampicilina e penicilina, ao aminoglicosídeo canamicina e ao macrólido eritromicina. Este perfil de resistência é mantido na estirpe SM39 curada, sugerindo que a resistência a estes antibióticos é mediada por outros mecanismos de resistência, como o gene *mecA*, que confere resistência aos β -lactâmicos. No entanto, a observação de uma redução nos valores de CMIs dos β -lactâmicos nesta estirpe sugere a existência de algum determinante de resistência a esta classe de antibióticos no plasmídeo pSM39 (Tabela 16 – Resultados). Uma vez que nenhuma classe de antibióticos está descrita como sendo substrato da

bomba QacA, foi pesquisada a presença de outros elementos no plasmídeo pSM39 que possam determinar resistência aos β -lactâmicos, como a presença de β -lactamase (62).

A presença de β -lactamase foi confirmada pelo teste da nitrocefina somente na estirpe SM39, evidenciando que o seu determinante, *blaZ*, se encontra no plasmídeo pSM39. Este resultado vai ao encontro de outros estudos que indicam a presença simultânea do determinante *blaZ* e do gene *qacA* em plasmídeos (3, 8, 118). No entanto, a redução da CMI da oxacilina na estirpe SM39 curada aponta para o envolvimento de outros mecanismos de resistência, uma vez que à partida, a oxacilina não é hidrolisada por β -lactamases. Este resultado poderá ser explicado por (i) a possibilidade da estirpe SM39 apresentar um fenótipo de hiperprodução de β -lactamase, que pode resultar num certo nível de resistência à oxacilina, como demonstrado em estudos anteriores (66, 73); ou (ii) pelo facto dos sistemas reguladores do gene *blaZ* (*blaI* e *blaR1*) poderem co-regular a expressão do gene *mecA* e consequentemente, a produção de PBP2a (70), devido à existência de sequências de aminoácidos homólogas entre os genes reguladores de *blaZ* e *mecA* (35, 39, 58).

As CMIs das fluoroquinolonas ciprofloxacina e norfloxacin e dos β -lactâmicos também apresentaram uma redução significativa na presença de tioridazina e clorpromazina, para todas as estirpes (Tabela 18 - Resultados). Tal como evidenciado pelos ensaios de fluorimetria, esta redução pode ocorrer pela acção destes inibidores na actividade/fonte de energia das bombas de efluxo codificadas no cromossoma de *S. aureus* como a NorA, NorB ou NorC, associadas ao efluxo de fluoroquinolonas (45, 114, 115) e a AbcA, mais recentemente associada ao efluxo de β -lactâmicos (116). No que respeita aos β -lactâmicos, estudos recentes observaram um aumento da susceptibilidade de estirpes MRSA à oxacilina e a outros β -lactâmicos na presença de tioridazina e postularam que esta ao actuar na membrana celular pode afectar a transcrição do gene *mecA* (responsável pela resistência à oxacilina) e do gene *blaZ*, resultando na diminuição do nível proteico de PBP2a, e por conseguinte do nível de resistência aos β -lactâmicos (9, 49)

Assim, o estudo desenvolvido permite correlacionar a bomba de efluxo QacA e o plasmídeo pSM39 com o fenótipo de multirresistência apresentado pela estirpe SM39, uma vez que esta tem a capacidade de conferir susceptibilidade reduzida a múltiplos compostos antimicrobianos química e estruturalmente diferentes, como os QACs

(cetrimida, cloreto de benzalcônio, entre outros), a diamidinas (pentamidina) e a corantes (como o brometo de etídeo e a acriflavina). Este efeito é ainda demonstrado pelos ensaios de fluorometria nos quais se observa um efluxo acentuado na estirpe SM39. Para além do mais, o plasmídeo pSM39 com o determinante *qacA* também transporta o determinante *blaZ*, envolvido na resistência a β -lactâmicos.

Os resultados deste estudo estão de acordo com os resultados obtidos num estudo anterior no qual foi analisado o efeito da bomba QacA, codificada por um plasmídeo de 32 Kb, na estirpe MRSA HPV107, representante do chamado Clone Ibérico (20). No estudo por Costa *et al.* (20) verificou-se que a bomba de efluxo QacA era responsável pela susceptibilidade reduzida da estirpe HPV107 ao mesmo conjunto de biocidas e corantes. Comparando os dados obtidos neste trabalho com esse estudo, verifica-se que os níveis de susceptibilidade reduzida conferidos pela bomba QacA nas duas estirpes são semelhantes, verificando-se no entanto que na presença de inibidores de efluxo a redução de CMIs foi maior na estirpe SM39 e para um maior número de biocidas e corantes. Devido à semelhança entre os resultados obtidos para as estirpes SM39 e HPV107, e uma vez que ambas apresentam plasmídeos de elevada dimensão, foi colocada a hipótese de que o plasmídeo pSM39 pudesse ser semelhante ao plasmídeo da estirpe HPV107. No entanto, ao contrário do que sucede com o plasmídeo pSM39, o plasmídeo da estirpe HPV107 não possui o gene *blaZ*, colocando de parte a hipótese dos dois plasmídeos serem o mesmo, o que foi também comprovado por uma análise preliminar dos mapas de restrição destes dois plasmídeos (Costa, S.S., comunicação pessoal). A comparação entre os dois plasmídeos apoia a hipótese colocada de que a alteração dos valores das CMIs para a oxacilina na estirpe SM39 se poderá dever à co-regulação do gene *mecA* pelo operão da β -lactamase presente no plasmídeo pSM39, já que na estirpe HPV107 as CMIs para os β -lactâmicos e em particular para a oxacilina, não sofrem alteração após perda do plasmídeo.

– Breve análise do plasmídeo pSM39

Uma vez que foi detectada a presença conjunta dos determinantes *qacA* e *blaZ* no plasmídeo pSM39, foi realizada uma análise bibliográfica sobre plasmídeos de maior tamanho, que transportem estes dois genes, de forma a compreender melhor a

constituição do plasmídeo pSM39 e verificar se este corresponderia a algum dos plasmídeos já descritos para *S. aureus*. Na literatura encontram-se descritos alguns plasmídeos com estas características, de entre os quais, os apresentados na Tabela 22.

Tabela 22. Alguns plasmídeos que conferem multirresistência descritos para *S. aureus* (28, 43, 63, 110).

Plasmídeo	Tamanho	Determinantes de resistência (transposões)	Resistências
pSK1	28,4 Kb	<i>qacA</i> , <i>aacA-aphD</i> (Tn4001), <i>dfrA</i> (Tn4003)	QACs, brometo de etídeo, acriflavina, aminoglicosídeos gentamicina, canamicina e tobramicina, trimetoprim.
pSK7	23,7 Kb	<i>qacA</i> , <i>dfrA</i> (Tn4003)	QACs, brometo de etídeo, acriflavina, trimetoprim
pSK4	35,1 Kb	<i>qacA</i> , <i>blaZ</i> (Tn552) <i>aacA-aphD</i> (Tn4001), <i>dfrA</i> (Tn4003),	QACs, brometo de etídeo, acriflavina, aminoglicosídeos gentamicina, canamicina e tobramicina, trimetoprim, penicilina
pSK14	24,4 Kb	<i>qacA</i> , <i>aacA-aphD</i> (Tn4001)	QACs, brometo de etídeo, acriflavina, aminoglicosídeos gentamicina, canamicina e tobramicina.
pSK18	19,7 Kb	<i>qacA</i>	QACs, brometo de etídeo, acriflavina
pSK57	31,2 Kb	<i>qacA</i> , <i>blaZ</i> (Tn552), <i>mcr</i> , <i>cadA</i>	QACs, brometo de etídeo, acriflavina, penicilina, mercúrio, cádmio

Comparando as características dos plasmídeos de *S. aureus* já descritos (Tabela 22) com as propriedades já conhecidas do plasmídeo pSM39, este último poderá ser um plasmídeo de *S. aureus* ainda não identificado. Pelos resultados obtidos até ao momento, o plasmídeo pSM39 não possui elementos de resistência a aminoglicosídeos (*aacA-aphD* - Tn4001), como o pSK4, nem ao trimetoprim (*dfrA* - Tn4003), como o pSK1 (43, 63). Dos plasmídeos apresentados na Tabela 22, aquele com o qual pSM39 apresenta mais semelhanças é o pSK57, ambos possuindo os genes *blaZ* e *qacA*.

No entanto, uma análise preliminar do mapa de restrição do plasmídeo pSM39, realizada após esta pesquisa bibliográfica, indicou que este não corresponderá ao pSK57 (dados não apresentados). Embora esta análise preliminar não tenha permitido identificar o plasmídeo pSM39 com nenhum dos descritos até à data, as semelhanças/elementos que apresenta em comum com a maioria dos plasmídeos referidos anteriormente, nomeadamente o tamanho e a presença simultânea dos genes para a QacA e para uma β -lactamase, levam a inferir que se tratará muito provavelmente de um plasmídeo relacionado, em termos de estrutura e composição, com os já descritos na literatura. Como para todos estes plasmídeos, não se verificou a

presença de nenhum determinante adicional de bomba de efluxo MDR, como a Smr. Esta observação apoia a inferência feita ao longo desta Dissertação de que os efeitos observados na presença/ausência do plasmídeo pSM39, a nível de susceptibilidade aos diferentes compostos antimicrobianos testados e a nível da actividade de efluxo, se deverão única e exclusivamente, à presença/ausência do gene *qacA* e do seu respectivo produto, a bomba de efluxo QacA. No entanto, tratando-se de um plasmídeo de dimensão razoável (cerca de 35 Kb), cuja sequência ainda não é conhecida, tal inferência só poderá ser totalmente comprovada com a determinação da sequência completa do plasmídeo pSM39.

– **Estudo da bomba de efluxo Smr no perfil de susceptibilidade aos biocidas e corantes**

Para o estudo da bomba de efluxo Smr, foi seguido o raciocínio aplicado para o estudo da bomba QacA, tendo sido proposto inicialmente a cura do plasmídeo pSM52 da estirpe SM52, de forma a possibilitar a comparação do efeito da Smr entre as estirpes isogénicas SM52 e a sua derivada curada. No entanto, nenhum dos vários métodos de cura de plasmídeo testados neste estudo para a estirpe SM52, nomeadamente a cultura na presença das fenotiazinas clorpromazina e promazina, do antibiótico novobiocina, a temperaturas críticas de crescimento, na presença do detergente SDS e directamente a partir de “stocks” congelados, permitiu obter a estirpe SM52 curada. Esta dificuldade em obter a cura do plasmídeo foi inesperada, uma vez que esta abordagem é prática usual em estudos semelhantes com plasmídeos de *S. aureus* (7, 37). Posteriormente, de forma a obter a cura do plasmídeo pSM52, foi ainda realizada a electroporação da estirpe SM52 (dados não apresentados), que também não permitiu obter a estirpe SM52 curada. Assim, a alternativa utilizada nesta Dissertação para estudar o efeito da bomba Smr, foi a de transferir o plasmídeo pSM52 para uma estirpe de referência susceptível a antibióticos, a RN4220 e analisar o efeito deste plasmídeo e consequentemente, da bomba Smr através da comparação desta com a estirpe isogénica electrotransformada com o plasmídeo pSM52, a RN4220:pSM52.

A análise dos perfis de susceptibilidade das estirpes em estudo mostra que as estirpes que transportam o plasmídeo pSM52 e a bomba de efluxo Smr apresentam

valores de CMIs dos QACs monovalentes brometo de hexadeciltrimetilamónio, cloreto de benzalcónio, ceftriaxona e cloreto de cetilpiridínio, o corante brometo de etídeo e a berberina, superiores aos da estirpe susceptível RN4220 (Tabela 19 - Resultados). Em particular, a transferência do plasmídeo pSM52 para a estirpe RN4220 resultou no aumento significativo da CMI do brometo de etídeo para 16 mg/L. Estes valores de CMIs permitem então inferir sobre o envolvimento do plasmídeo pSM52 e do determinante que transporta, o *smr*, na susceptibilidade reduzida a biocidas na estirpe RN4220:pSM52, e de forma mais indirecta, no isolado clínico MRSA SM52.

A redução das CMIs destes compostos para as estirpes SM52 e RN4220:pSM52 na presença de inibidores de efluxo, nomeadamente as fenotiazinas tioridazina e clorpromazina, também permitiu evidenciar a associação entre este perfil de susceptibilidade reduzida e a actividade de efluxo associada à bomba de efluxo Smr (Tabela 21 - Resultados). Esta associação directa é possível uma vez que a sequência do plasmídeo pSM52 foi determinada na sua totalidade, sendo o gene *smr* o único determinante de resistência presente neste plasmídeo, para além de um duplicado parcial deste mesmo gene, Δsmr (22), que não deverá codificar para uma proteína funcional, já que não possui a sequência C- terminal de Smr, essencial para a funcionalidade desta proteína (84).

A utilização da fluorometria em tempo real permitiu confirmar a presença de actividade de efluxo nas estirpes que possuem a bomba de efluxo Smr. Nos ensaios de acumulação verificou-se que a estirpe RN4220:pSM52 apresenta menor acumulação de EtBr quando comparada com a estirpe isogénica RN4220 e a estirpe SM52 (Figura 18 – Resultados). A acumulação de EtBr nestas estirpes sofreu um aumento significativo na presença de verapamil, o inibidor mais eficaz, sendo o efeito deste sobre RN4220 menor (Figura 19 – Resultados). Por sua vez, foi observada uma maior capacidade das estirpes SM52 e RN4220:pSM52, em comparação com a estirpe RN4220, de extrusar o substrato brometo de etídeo, demonstrando assim a maior actividade de efluxo presente nas estirpes com o plasmídeo pSM52 e o determinante *smr*. A actividade de efluxo presente nestas estirpes mostrou ser dependente de glucose e, na presença desta, inibida pelo verapamil (Figura 20 – Resultados).

Neste estudo e à semelhança do estudo da bomba de efluxo QacA, também se observou que os inibidores com maior efeito na redução dos valores de CMIs foram as

fenotiazinas tioridazina e clorpromazina, enquanto nos ensaios de fluorometria, o verapamil foi o inibidor que demonstrou maior efeito na acumulação/extrusão de EtBr.

A conjugação dos dados obtidos por determinação de CMIs e por fluorometria, possibilita correlacionar a bomba de efluxo Smr com a susceptibilidade reduzida a biocidas e corantes em *S. aureus*. As estirpes com a bomba Smr (SM52 e RN4220:pSM52) apresentam maior actividade de efluxo e valores de CMIs dos biocidas e corantes, que para além de serem mais elevados, apresentam uma redução pronunciada na presença de inibidores de efluxo para valores inferiores aos apresentados pela estirpe de referência (na ausência de inibidor).

– Estudo da bomba de efluxo Smr no perfil de susceptibilidade aos antibióticos

Relativamente ao perfil de susceptibilidade a antibióticos, observou-se que a estirpe SM52 apresenta resistência a vários dos antibióticos testados, nomeadamente às fluoroquinolonas, aos β -lactâmicos, ao aminoglicosídeo canamicina e ao cloranfenicol. Contudo, a transferência do plasmídeo pSM52 não conferiu esse perfil de resistência à estirpe RN4220:pSM52, indicando que o plasmídeo pSM52/bomba de efluxo Smr não exerce qualquer efeito sobre a susceptibilidade aos antibióticos. Esta explicação é também suportada pelo facto de não haver qualquer antibiótico descrito como substrato da bomba Smr (33).

Observou-se também uma redução dos valores de CMIs dos antibióticos β -lactâmicos oxacilina, ampicilina e penicilina na presença de tioridazina e clorpromazina para as estirpes em estudo, sendo essa redução bastante significativa no caso da estirpe SM52 (Tabela 21- Resultados). No entanto, dado que, como já referido, nenhuma classe de antibióticos, e em particular os β -lactâmicos, está descrita como substrato da bomba Smr, esta inibição poderá ocorrer ao nível do efluxo pela bomba de efluxo cromossómica AbcA, descrita como estando envolvida no efluxo de β -lactâmicos (116) ou pela acção destes compostos na membrana celular, levando à diminuição do nível proteico de PBP2a, como anteriormente descrito (9, 49).

Em suma, a abordagem utilizada nesta Dissertação, permitiu observar que a transferência do pSM52/*smr* para a estirpe pan-susceptível RN4220 resultou na aquisição de resistência a múltiplos compostos antimicrobianos pela estirpe

RN4220:pSM52, entre eles os QACs brometo de hexadeciltrimetilamónio, cloreto de benzalcónio, cetrimida e cloreto de cetilpiridínio, o corante brometo de etídeo e a berberina, bem como no aumento significativo da actividade de efluxo de EtBr, como verificado nos ensaios de fluorimetria em tempo real. Estes resultados demonstram o papel desempenhado pela bomba Smr nesta actividade e no fenótipo de multirresistência em *S. aureus*.

– Conclusões gerais

Os resultados obtidos nesta Dissertação, sobre o papel desempenhado pelas bombas de efluxo QacA e Smr em estirpes MRSA de origem clínica, demonstram a importância da resistência por efluxo a diferentes biocidas utilizados a nível hospitalar e na comunidade e no desenvolvimento de multirresistência a compostos química e estruturalmente distintos.

Neste trabalho foram utilizadas metodologias que permitiram avaliar e caracterizar directamente a actividade de efluxo, nomeadamente a determinação de CMIs na ausência e presença de inibidores de efluxo e os ensaios de fluorometria para a análise destes sistemas em tempo-real, mostrando-se uma mais valia na identificação e estudo da resistência mediada por efluxo em bactérias multirresistentes. De futuro, outras abordagens metodológicas poderão também ser utilizadas de forma a complementar os resultados obtidos nesta Dissertação, em particular, a caracterização mais detalhada do efeito bactericida dos biocidas estudados e a avaliação de um conjunto mais alargado de diferentes classes de biocidas.

A susceptibilidade reduzida aos biocidas representa um problema grave, com particular ênfase em estirpes MRSA multirresistentes, pois pode conduzir à ineficácia das medidas de controlo e prevenção actualmente implementadas em ambiente hospitalar. A presença dos determinantes de resistência a biocidas mediada por efluxo, em particular em elementos genéticos móveis que permitem a sua transmissão entre estirpes, pode contribuir para uma selecção, manutenção e disseminação de isolados MRSA. Este problema é importante, não somente no meio hospitalar, mas igualmente na comunidade, uma vez que a utilização de produtos contendo compostos biocidas tem vindo a generalizar-se entre a população (32, 105). Vários estudos apontam para uma grande incidência dos genes *qacA/B* e *smr* em isolados de *S. aureus*, sendo a sua

presença mais associada a estirpes MRSA (41, 61, 68, 81). Para além disso, estudos adicionais indicam que esta resistência é mais elevada em estirpes MRSA do que em estirpes de *S. aureus* sensíveis à meticilina (MSSA, de “methicillin-sensitive *S. aureus*”) (2, 32, 80, 103, 125).

Uma vez que a bomba QacA confere níveis de resistência mais elevados e a um maior número de biocidas do que a bomba Smr, seria de esperar uma maior prevalência de QacA entre isolados clínicos de *S. aureus* e em particular, de MRSA. Contudo, alguns estudos têm descrito uma maior prevalência de Smr em isolados MRSA, em relação a QacA (61, 80), embora o número de estudos que descrevem uma análise sistemática da prevalência dos dois tipos de determinantes entre isolados de origem clínica seja ainda muito escasso. A maior estabilidade de plasmídeos de menor dimensão que transportam o gene *smr*, como verificado ao longo desta Dissertação, poderá explicar a maior prevalência deste gene entre isolados de MRSA.

Outro aspecto importante abordado nesta Dissertação é a potencial co-selecção de resistência entre antibióticos e biocidas. Tal como encontrado neste trabalho, outros estudos têm evidenciado uma associação entre os determinantes *qacA/smr* e consequente susceptibilidade reduzida a biocidas, com a co-selecção de estirpes de *S. aureus* multirresistentes, como estirpes MRSA (121). Um exemplo de co-selecção encontrado neste trabalho é a presença simultânea de *blaZ* e *qacA* num plasmídeo, o que permite inferir sobre a possível ligação entre a resistência a biocidas e a resistência a antibióticos β -lactâmicos, como já observado anteriormente (8, 106, 118). No entanto, a possibilidade de co-selecção de resistência entre antibióticos e biocidas é um tópico que se mantém controverso, já que outros estudos apontam para a não-existência de co-selecção e consequentemente, de co-resistência (55). No entanto, o facto de ainda não se ter chegado a uma conclusão acerca desta questão e dada a sua relevância a nível clínico e de Saúde Pública, reforçam a necessidade de se continuar a estudar o papel desempenhado pelos sistemas de efluxo na multirresistência a compostos antimicrobianos, em particular em agentes patogénicos como *S. aureus*.

5 Referências Bibliográficas

1. **Aeschlimann, J. R., L. D. Dresser, G. W. Kaatz, and M. J. Rybak.** 1999. Effects of NorA inhibitors on in vitro antibacterial activities and postantibiotic effects of levofloxacin, ciprofloxacin, and norfloxacin in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:335-340.
2. **Al-Masaudi S. B., M. J. Day, and A. D. Russell.** 1991. Antimicrobial resistance and gene transfer in *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Bacteriol.* **70**:279-290.
3. **Anthonisen, I. L., M. Sunde, T. M. Steinum, M. S. Sidhu, and H. Sorum.** 2002. Organization of the antiseptic resistance gene *qacA* and Tn552-related β -lactamase genes in multidrug resistance *Staphylococcus haemolyticus* strains of animal and human origins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3606-3612.
4. **Bambeke, F. V., E. Balzi, and P. M. Tulkens.** 2000. Antibiotic efflux pumps. *Biochem. Pharmacol.* **60**:457-470.
5. **Bannerman, T. L.** 2003. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically, p384-405. In P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Tenover and R.H. Tenover (8th edição), *Manual of Clinical Microbiology*, vol.1, American Society for Microbiology I, Washington, D.C.
6. **Bjorland, J., M. Sunde, and S. Waage.** 2001. Plasmid-borne *smr* gene causes resistance to quaternary ammonium compounds in bovine *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **39**:3999-4004.
7. **Bjorland, J., T. Steinum, M. Sunde, S. Waage, and E. Heir.** 2003. Novel plasmid-borne gene *qacJ* mediates resistance to quaternary ammonium compounds in equine *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus simulans*, and *Staphylococcus intermedius*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3046-3052.
8. **Bjorland, J., T. Steinum, B. Kvitle, S. Waage, M. Sunde, and E. Heir.** 2005. Widespread distribution of disinfectant resistance genes among staphylococci of bovine and caprine origin in Norway. *J. Clin. Microbiol.* **43**:4363-4368.
9. **Bonde, M., D. H. Højland, H. J. Kolmos, B. H. Kallipolitis, and J. K. Klitgaard.** 2011. Thioridazine affects transcription of genes involved in cell wall biosynthesis in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **318**:168-176.
10. **Borges-Walmsley, M. I., K. S. McKeegan, and A. R. Walmsley.** 2003. Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochem. J.* **376**:317-338.

11. **Brown, M. H., and R. A. Skurray.** 2001. Staphylococcal multidrug efflux protein QacA. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**:163-170.
12. **Casey, A. L., P. A. Lambert, and T. S. J. Elliott.** 2007. Staphylococci. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **3**:S23-S32.
13. **Chambers, H. F.** 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:781-791.
14. **Chapman, J. S.** 2003. Biocide resistance mechanisms. *Int. Biodeterior. Biodegradation.* **51**:133-138.
15. **Chesneau, O., H. Ligeret, N. Hosan-Aghaie, A. Morvan, and E. Dassa.** 2005. Molecular analysis of resistance to streptograminA compounds conferred by the Vga proteins of staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:973-980.
16. **Chopra, I.** 2002. Antibiotics. *In: Encyclopedia of Life Sciences.* John Wiley & Sons, Ltd. Chicester. <http://www.els.net/>.
17. **Chung, M., H. Lencastre, P. Mathews, A. Tomasz, I. Adamsson, M. A. Sousa, T. Camou, C. Cocuzza, A. Corso, I. Couto, A. Dominguez, M. Gniadkowski, R. Goering, A. Gomes, K. Kikuchi, A. Marchese, R. Mato, O. Melter, D. Oliveira, R. Palacio, R. Sá-Leão, I. Sanches, J. H. Song, P. T. Tassios, and P. Villari.** 2000. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb. Drug Resist.* **6**:189-198.
18. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Sixteenth Informational Supplement M100-S16. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, E.U.A.
19. **Coia, J. E., G. J. Duckworth, D. I. Edwards, M. Farrington, C. Fry, H. Humphreys, C. Mallaghan, and D. R. Tucker.** 2006. Guidelines for the control and prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in healthcare facilities. *J. Hosp. Infect.* **63S**:S1-S44.
20. **Costa, S. S., E. Ntokou, A. Martins, M. Viveiros, S. Pournaras, I. Couto, and L. Amaral.** 2010. Identification of the plasmid-encoded *qacA* efflux pump gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain HPV107, a representative of the MRSA Iberian clone. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **36**:557-561.
21. **Costa, S. S., C. Falcão, M. Viveiros, D. Machado, M. Martins, J. Melo-Cristino, L. Amaral, and I. Couto.** 2011a. Exploring the contribution of efflux on the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* **11**:241.

22. **Costa, S. S., C. Mourato, M. Viveiros, J. Melo-Cristino, L. Amaral, and I. Couto.** 2011b. Description of a novel pC194-family plasmid carrying the *smr* efflux pump gene, abstr. C1-617. 51st Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother (ICAAC). Chicago, E.U.A.
23. **Couto, I., S. S. Costa, M. Viveiros, M. Martins, and L. Amaral.** 2008. Efflux-mediated response of *Staphylococcus aureus* exposed to ethidium bromide. J. Antimicrob. Chemother. **62**:504-513.
24. **DeMarco, C. E., L.A. Cushing, E. Frempong-Manso, S. M. Seo, T. A. A. Jaravaza, and G. W. Kaatz.** 2007. Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and biocidas in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **51**:3235-3238.
25. **Emslie, K. R., D. E. Townsend, and W. B. Grubb.** 1986. Isolation and characterization of a family of small plasmids encoding resistance to nucleic acid-binding compounds in *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol. **22**:9-15.
26. **Euzéby, J. P.** (ed.) 1998-2010. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. Int. J. Syst. Bacteriol. List of procaryotic names with standing in nomenclature – genus *Staphylococcus*. ASM Press [<http://www.bacterio.net>, 11 de Fevereiro de 2012].
27. **Falcão, C. M.** 2009. Importância dos sistemas de efluxo na resistência às fluoroquinolonas em *Staphylococcus aureus*. Tese de Mestrado em Microbiologia Médica. Universidade Nova de Lisboa.
28. **Firth, N., S. Apisiridej, T. Berg, B. A. O'Rourke, S. Curnock, K. G. H. Dyke, and R. A. Skurray.** 2000. Replication of staphylococcal multiresistance plasmids. J. Bacteriol. **182**:2170-2178.
29. **Fraiese, A. P.** 2002. Biocide abuse and antimicrobial resistance – a cause for concern? J. Antimicrob. Chemother. **49**:11-12.
30. **Frempong-Manso, E., J. L. Raygada, C. E. DeMarco, S. M. Seo, and G. W. Kaatz.** 2009. Inability of a reserpine-based screen to identify strains overexpressing efflux pump genes in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Int. J. Antimicrob. Agents. **33**:360-363.
31. **Giedraitienė, A., A. Vitkauskienė, R. Naginienė, and A. Pavilionis.** 2011. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. Medicina (Kaunas). **47**:137-146.

32. **Gilbert, P., and A. J. McBain.** 2003. Potencial impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**:189-208.
33. **Grinius, L. L., and E. B. Goldberg.** 1994. Bacterial multidrug resistance is due to a single membrane protein which functions as a drug pump. *J. Biol. Chem.* **269**:29998-30003.
34. **Grkovic, S., M. H. Brown, and R. A. Skurray.** 2002. Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**:671-701.
35. **Hackbarth, C. J., and H. F. Chambers.** 1993. *blaI* and *blaR1* regulate β -lactamase and PBP2a production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:1144-1149.
36. **Hancock, R. E.** 2005. Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. *Lancet Infect Dis.* **5**:209-218.
37. **Heir, E., G. Sundheim, and A. L. Holck.** 1998. The *Staphylococcus qacH* gene product: a new member of the SMR family encoding multidrug resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* **163**:49-56.
38. **Heir, E., G. Sundheim, and A. L. Holck.** 1999. The *qacG* gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry. *J. Appl. Microbiol.* **86**:378-388.
39. **Hiramatsu, K., K. Asada, E. Suzuki, K. Okonogi, and T. Yokota.** 1992. Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the regulator region of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *FEBS Lett.* **298**:133-136.
40. **Hiramatsu, K., H. Hanaki, T. Ino, K. Yabuta, T. Oguri, and F. C. Tenover.** 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**:135-136.
41. **Ho, J., and J. Branley.** 2011. The influence of the hand hygiene campaign on the prevalence of antiseptic resistance genes in MRSA isolates in Australia, abstr. K-1442. 51st Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother (ICAAC). Chicago, E.U.A.
42. **Huang, J., P. W. O'Toole, W. Shen, H. Amrine-Madsen, X. Jiang, N. Lobo, L. M. Palmer, L. Voelker, F. Fan, M.N. Gwynn, and D. McDevitt.** 2004. Novel chromosomally encoded multidrug efflux transporter MdeA in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:909-917.

43. **Jensen, S. O., S. Apisiridej, S. M. Kwong, Y. H. Yang, R. A. Skurray, and N. Firth.** 2010. Analysis of the prototypical *Staphylococcus aureus* multiresistance plasmid pSK1. *Plasmid*. **64**:135-142.
44. **Jones, R. N.** 2008. Key considerations in the treatment of complicated staphylococcal infections. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**:3-9.
45. **Kaatz, G. W., S. M. Seo, and C. A. Ruble.** 1993. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:1086-1093.
46. **Kaatz, G. W., and S. M. Seo.** 1995. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:2650-2655.
47. **Kaatz, G. W., V.V. Moudgal, S. M. Seo, and J. E. Kristiansen.** 2003. Phenothiazines and thioxanthenes inhibit multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:719-726.
48. **Kaatz, G. W., F. McAleese, and S. M. Seo.** 2005. Multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* due to overexpression of a novel multidrug and toxin extrusion (MATE) transport protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:1857-1863.
49. **Klitgaard, J. K., M. N. Skov, B. H. Kallipolitis, and H. J. Kolmos.** 2008. Reversal of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* by thioridazine. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**:1215-1221.
50. **Köljalg, S., P. Naaber, and M. Mikelsaar.** 2002. Antibiotic resistance as an indicator of bacterial chlorhexidine susceptibility. *J. Hosp. Infect.* **51**:106-113.
51. **Kraemer, G. R., and J. J. Iandolo.** 1990. High-frequency transformation of *Staphylococcus aureus* by electroporation. *Curr. Microbiol.* **21**:373-376.
52. **Kreiswirth, B. N., S. Lofdahl, M. J. Betley, M. O'Reilly, P. M. Schlievert, M. S. Bergdoll, and R. P. Novick.** 1983. The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature*. **305**:709-712.
53. **Kristiansen, M. M., C. Leandro, D. Ordway, M. Martins, M. Viveiros, T. Pacheco, J. Molnar, J. E. Kristiansen, and L. Amaral.** 2006. Thioridazine reduces resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by inhibiting a reserpine-sensitive efflux pump. *In vivo*. **20**:361-366.
54. **Kluytmans, J., A. Van Belkum, and H. Verbrugh.** 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:505-520.
55. **Lambert, R. J. W.** 2004. Comparative analysis of antibiotic and antimicrobial biocide susceptibility data in clinical isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus*

- aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* between 1989 and 2000. J. Appl. Microbiol. **97**:699-711.
56. **Leelaporn, A., I. T. Paulsen, J. M. Tennent, T. G. Littlejohn, and R. A. Skurray.** 1994. Multidrug resistance to antiseptics and disinfectants in coagulase-negative staphylococci. J. Med. Microbiol. **40**:214-220.
 57. **Leelaporn, A., N. Firth, I. T. Paulsen, A. Hettiaratchi, and R. A. Skurray.** 1995. Multidrug resistance plasmid pSK108 from coagulase-negative staphylococci; relationships to *Staphylococcus aureus qacC* plasmids. Plasmid. **34**:62-67.
 58. **Lewis R. A., and K. G. H. Dyke.** 2000. MecI represses synthesis from the β -lactamase operon of *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. **45**:139-144.
 59. **Liu, Q., M. Liu, Q. Wu, C. Li, T. Zhou, and Y. Ni.** 2009. Sensitivities to biocides and distribution of biocide resistance genes in quaternary ammonium compound tolerant *Staphylococcus aureus* isolated in a teaching hospital. Scand. J. Infect. Dis. **41**:403-409.
 60. **Livermore, D. M.** 2000. Antibiotic resistance in staphylococci. Int. J. Antimicrob. Agents. **16**:S3-S10.
 61. **Longtin, J., C. Seah, K. Siebert, A. McGeer, A. Simor, Y. Longtin, D. E. Low, and R. G. Melano.** 2011. Distribution of antiseptic resistance genes *qacA*, *qacB*, and *smr* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Toronto, Canada, from 2005 to 2009. Antimicrob. Agents Chemother. **55**:2999-3001.
 62. **Lowy, F. D.** 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Invest. **111**:1265-1273.
 63. **Lyon, B. R., and R. A. Skurray.** 1987. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. Microbiol. Rev. **51**:88-134.
 64. **Macinga, D. R., J.D. Rutter, and M.J. Dolan.** 2010. High-level resistance to quaternary ammonium compounds in clinical MRSA isolates, abstr. 528. 5th Decennial International Conference on Healthcare-Associated Infections (ICHA). Atlanta, E.U.A.
 65. **Marquez, B.** 2005. Bacterial efflux systems and efflux pump inhibitors. Biochimie. **87**:1137-1147.
 66. **Martineau, F., F. J. Picard, N. Lansac, C. Ménard, P. H. Roy, M. Ouellette, and M. G. Bergeron.** 2000. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob. Agents Chemother. **44**:231-238.

67. **Martins M., B. Santos, A. Martins, M. Viveiros, I. Couto, A. Cruz, J. M. Pagès, J. Molnar, S. Fanning, and L. Amaral.** 2006. An instrument-free method for the demonstration of efflux pump activity of bacteria. *In vivo*. **20**:657-664.
68. **Mayer, S., M. Boos, A. Beyer, A. C. Fluit, and F. J. Schmitz.** 2001. Distribution of the antiseptic resistance genes *qacA*, *qacB* and *qacC* in 497 methicillin-resistant and susceptible European isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**:893–905.
69. **McDonell, G., and A. D. Russell.** 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**:147-179.
70. **McKinney, T. K., V. K. Sharma, W. A. Craig, and G. L. Archer.** 2001. Transcription of the gene mediating methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (*mecA*) is corepressed but not coinduced by cognate *mecA* and β -lactamase regulators. *J. Bacteriol.* **183**:6862-6868.
71. **Melo-Cristino, J.** 2000. *Staphylococcus*. p39-49. *In* W.F.C. Ferreira and J.C.F. de Sousa (1^a edição.) Microbiologia, vol.2. Lidel-edições técnicas, Lisboa.
72. **Mitchell, B. A., I. T. Paulsen, M. H. Brown, and R. A. Skurray.** 1999. Bioenergetics of the staphylococcal multidrug export protein QacA – identification of distinct binding sites for monovalent and divalent cations. *J. Biol. Chem.* **274**:3541-3547.
73. **Nadarajah, J., M. J. S. Lee, L. Louie, L. Jacob, A. E. Simor, M. Louie, and M. J. McGavin.** 2006. Identification of different clonal complexes and diverse amino acid substitutions in penicillin-binding protein 2 (PBP2) associated with borderline oxacillin resistance in Canadian *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Med. Microbiol.* **55**:1675-1683.
74. **Nair, D., G. Memmi, D. Hernandez, J. Bard, M. Beaume, S. Gill, P. Francois, and A. L. Cheung.** 2011. Whole-genome sequencing of *Staphylococcus aureus* strain RN4220, a key laboratory strain used in virulence research, identifies mutations that affect not only virulence factors but also the fitness of the strain. *J. Bacteriol.* **193**:2332-2335.
75. **Narui, K., N. Noguchi, K. Wakasugi, and M. Sasatsu.** 2002. Cloning and characterization of a novel chromosomal drug efflux gene in *Staphylococcus aureus*. *Biol. Pharm. Bull.* **25**:1533-1536.
76. **Narui, K., M. Takano, N. Noguchi, and M. Sasatsu.** 2007. Susceptibilities of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates to seven biocides. *Biol. Pharm. Bull.* **30**:585-587.

77. **Neifakh, A. A., C. M. Borsch, and G. W. Kaatz.** 1993. Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:128-129.
78. **Nikaido, H.** 2009. Multidrug resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **78**:119-146.
79. **Nobre, L. S., V. L. Gonçalves, and L. M. Saraiva.** 2008. Flavohemoglobin of *Staphylococcus aureus*. *Methods Enzymol.* **436**:203-216.
80. **Noguchi, N., M. Hase, M. Kitta, M. Sasatsu, K. Deguchi, and M. Kono.** 1999. Antiseptic susceptibility and distribution of antiseptic-resistance genes in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **172**:247-253.
81. **Noguchi, N., J. Suwa, K. Narui, M. Sasatsu, T. Ito, K. Hiramatsu, and J. H. Song.** 2005. Susceptibilities to antiseptic agents and distribution of antiseptic-resistance genes *qacA/B* and *smr* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Asia during 1998 and 1999. *J. Med. Microbiol.* **54**: 557-565.
82. **Novick, R. P.** 1991. Genetic systems in staphylococci. *Methods Enzymol.* **204**:587-636.
83. **Paixão, L., L. Rodrigues, I. Couto, M. Martins, P. Fernandes, C. Carvalho, G. A. Monteiro, F. Sansonetty, L. Amaral, and M. Viveiros.** 2009. Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in *Escherichia coli*. *J. Biol. Eng.* **3**:1-12.
84. **Paulsen, I. T., M. H. Brown, S. J. Dunstan, and R. A. Skurray.** 1995. Molecular characterization of the staphylococcal multidrug resistance export protein QacC. *J. Bacteriol.* **177**:2827-283.
85. **Paulsen, I. T., M. H. Brown, and R. A. Skurray.** 1996a. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* **60**:575-608.
86. **Paulsen, I. T., M. H. Brown, T. G. Littlejohn, B. A. Mitchell, and R. A. Skurray.** 1996b. Multidrug resistance proteins QacA and QacB from *Staphylococcus aureus*: membrane topology and identification of residues involved in substrate specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:3630-3635.
87. **Piddock, L. J. V.** 2006a. Multidrug-resistance efflux pumps – not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**:629-635.
88. **Piddock, L. J. V.** 2006b. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**:382-397.
89. **Poole, K.** 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**:20-51.

90. **Poole, K.** 2007. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann. Med.* **39**: 162-176.
91. **Poulsen, B. E., A. Rath, and C. M. Deber.** 2009. The assembly motif of a bacterial small multidrug resistance protein. *J. Biol. Chem.* **284**:9870-9875.
92. **Public Health Dispatch.** 2002a. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin. USA. MMWR. **51**:162-176.
93. **Public Health Dispatch.** 2002b. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. Pennsylvania. MMWR. **51**:902.
94. **Putman, M., H. W. V. Veen, and W. N. Konings.** 2000. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:672-688.
95. **QIAGEN.** 2003. QIAGEN Plasmid Purification Handbook. QIAGEN, Hilden, Alemanha.
96. **QIAGEN.** 2006. QIAprep® Miniprep Handbook. QIAGEN, Hilden, Alemanha.
97. **Reynolds, E., J. I. Ross, and J. H. Cove.** 2003. Msr(A) and related macrolide/streptogramin resistance determinants: incomplete transporters? *Int. J. Antimicrob. Agents.* **22**:228-236.
98. **Roberts, M. C.** 2003. Tetracycline therapy: update. *Clin. Infect. Dis.* **36**: 462-467.
99. **Roberts, M.C.** 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **245**:195-203.
100. **Rodrigues, L., J. Ramos, I. Couto, L. Amaral, and M. Viveiros.** 2011. Ethidium bromide transport across *Mycobacterium smegmatis* cell wall: correlation with antibiotic resistance. *BMC Microbiol.* **11**:35.
101. **Ross, J. I., E. A. Eady, J. H. Cove, and S. Baumberg.** 1996. Minimal functional system required for expression of erythromycin resistance by *mrsA* in *Staphylococcus aureus* RN4220. *Gene.* **183**:143-148.
102. **Russell, A. D.** 1995. Mechanisms of bacterial resistance to biocides. *Int. Biodeterior. Biodegradation.* **36**:247-265.
103. **Russell, A. D.** 1997. Plasmids and bacterial resistance to biocides. *J. Appl. Microbiol.* **82**:155-165.
104. **Russell, A. D., U. Tattawasart, and J.-Y. Maillard.** 1998. Possible link between bacterial resistance and use of antibiotics and biocides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2151.

105. **Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR).** 2009. Assessment of the antibiotic resistance effects of biocides. Bruxelles, Bélgica.
106. **Sidhu, M. S., E. Heir, T. Leegaard, K. Wiger, and A. Holck.** 2002. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with β -lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2797-2803.
107. **Smith, K., C. G. Gemmell, and I. S. Hunter.** 2008. The association between biocide tolerance and the presence or absence of *qac* genes among hospital-acquired and community acquired MRSA isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**:78-84.
108. **Sonstein, S. A., and J. N. Baldwin.** 1972. Loss of the penicillinase plasmid after treatment of *Staphylococcus aureus* with sodium docedyl sulfate. *J. Bacteriol.* **109**:262-265.
109. **Suller, M. T. E., and A. D. Russell.** 1999. Antibiotic and biocide resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococcus. *J. Hosp. Infect.* **43**:281-291.
110. **Tennent, J. M., B. R. Lyon, M. T. Gillespie, J. W. May, and R. A. Skurray.** 1985. Cloning and expression of *Staphylococcus aureus* plasmid-mediated quaternary ammonium resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**:79-83.
111. **Tenover, F. C.** 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am. J. Med.* **119**:S3-S10.
112. **Tisa, L. S., and B. P. Rosen.** 1989. Transport systems encoded by bacterial plasmids. *J. Bioenerg. Biomembr.* **22**:493-507.
113. **Truong-Bolduc, Q. C., X. Zhang, and D. C. Hooper.** 2003. Characterization of NorR protein, a multifunctional regulator of *norA* expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **185**:3127-3138.
114. **Truong-Bolduc, Q. C., P. M. Dunman., J. Strahilevitz, S. J. Projan, and D. C. Hooper.** 2005. MgrA is a multiple regulator of two new efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **187**:2395-2404.
115. **Truong-Bolduc, Q. C., J. Strahilevitz, and D.C. Hooper.** 2006. NorC, a new efflux pump regulated by MgrA of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:1104-1107.

116. **Truong-Bolduc, Q. C., and D. C. Hooper.** 2007. The transcriptional regulators NorG and MgrA modulate resistance to both quinolones and β -lactams in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **189**:2996-3004.
117. **Ubukata, K., N. Itoh-Yamashita, and M. Konno.** 1989. Cloning and expression of the *norA* gene for fluoroquinolones resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:1535-1539.
118. **Vali, L., S. E. Davies, L. L. G. Lai, J. Dave, and S. G. B. Amyes.** 2008. Frequency of biocide resistance genes, antibiotic resistance and the effect of chlorhexidine exposure on clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**:524-532.
119. **Viveiros, M., A. Martins, L. Paixão, L. Rodrigues, M. Martins, I. Couto, E. Fährnrich, W. V. Kern, and L. Amaral.** 2008a. Demonstration of intrinsic efflux activity of *E. coli* K-12 AG100 by an automated ethidium bromide method. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **31**:458-462.
120. **Viveiros, M., M. Martins, I. Couto, L. Rodrigues, G. Spengler, A. Martins, J.E. Kristiansen, J. Molnar, and L. Amaral.** 2008b. New methods for the identification of efflux mediated MDR bacteria, genetic assessment of regulators and efflux pump constituents, characterization of efflux systems and screening for inhibitors of efflux pumps. *Curr. Drug Targets.* **9**:1-17.
121. **Zhang, M., M. M. O'Donoghue, T. Ito, K. Hiramatsu, and M. V. Boost.** 2011. Prevalence of antiseptic-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci colonising nurses and the general population in Hong Kong. *J. Hosp. Infect.* **78**:113-117.
122. **Walsh, C., and S. Fanning.** 2008. Antimicrobial resistance in foodborne pathogens – a cause for concern? *Curr. Drug Targets.* **9**:808-810.
123. **Webber, M. A., and L. J. V. Piddock.** 2003. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:9-11.
124. **Yamada, Y., K. Hideka, S. Shiota, T. Kuroda, and T. Tsuchiya.** 2006. Gene cloning and characterization of SdrM, a chromosomally-encoded multidrug efflux pump, from *Staphylococcus aureus*. *Biol. Pharm. Bull.* **29**:554-556.
125. **Yamamoto, T., Y. Tamura, and T. Yokota.** 1988. Antiseptic and antibiotic resistance plasmid in *Staphylococcus aureus* that possesses ability to confer chlorhexidine and acrinol resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**:932-935.
126. **Ye, H. F., M. Zhang, M. O'Donoghue, and M. Boost.** 2012. Are *qacG*, *qacH* and *qacJ* genes transferring from food isolates to carriage isolates of staphylococci? *J. Hosp. Infect.* **80**:95-96.